

## スパッタカーボン薄膜を用いた重金属の電気化学検出とその応用に関する研究

著者	澤 博幸
発行年	2016
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2015
報告番号	12102甲第7673号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00143793">http://hdl.handle.net/2241/00143793</a>

筑波大学大学院博士課程

数理物質科学研究科博士論文

博士 (工学)

スパッタカーボン薄膜を用いた重金属の

電気化学検出とその応用に関する研究

柳澤 博幸

物性・分子工学専攻



## 内容

<b>第 1 章 序論</b> .....	1
1-1 背景.....	1
1-2 重金属の応用とその毒性.....	1
1-3 従来の重金属の分析法.....	2
1-3-1 沈殿反応を利用した系統分析.....	2
1-3-2 原子吸光分析法 (Atomic Absorption Spectrometry: AAS)、および誘導結合プラズマ法(Inductively Coupled Plasma: ICP)による分析.....	3
1-3-3 蛍光 X 線分析 (Fluorescent X-ray analysis).....	3
1-3-4 比色分析.....	4
1-3-5 電気化学分析 (アノードックストリップングボルタンメトリー: ASV 法).....	4
1-3-5-1 吊下げ水銀電極 (Hanging Mercury Drop Electrode: HMDE).....	5
1-3-5-2 水銀薄膜電極 (Mercury Film Electrode: MFE).....	5
1-4 ASV の利点と課題.....	5
1-5 ASV 法のバイオ分析への応用.....	6
1-6 本論文の目的.....	7
1-7 本論文の構成.....	8
1-8 参考文献.....	9
<b>第 2 章 アンバランスドマグネトロンスパッタ法で作製したカーボン薄膜を用いたカドミウム及び鉛の簡便かつ高感度分析法の開発</b> .....	10
2-1 はじめに.....	10
2-2 グラファイト型カーボン電極 ( $sp^2$ ).....	10
2-3 ダイヤモンド電極 ( $sp^3$ 型電極).....	11
2-4 $sp^2/sp^3$ 複合カーボン薄膜電極.....	12
2-4-1 ダイヤモンドライクカーボン (Diamond Like Carbon: DLC).....	12
2-4-2 電子サイクロトン共鳴スパッタ法で作製したカーボン薄膜.....	13
2-4-3 アンバランスドマグネトロンスパッタカーボン薄膜.....	15
2-5 着想に至った経緯.....	16
2-6 実験方法.....	17
2-6-1 使用試薬及び材料.....	17
2-6-2 UBM スパッタナノカーボン薄膜の形成.....	17
2-6-3 UBM ナノカーボン薄膜の作製方法.....	18
2-6-4 サイクリックボルタンメトリー法 (Cyclic Voltammetry: CV 法).....	18
2-6-5 重金属の電気化学分析.....	18
2-7 結果考察.....	20
2-7-1 UBM ナノカーボン薄膜の物理的性質と電気化学的性質.....	20
2-7-2 測定溶液の pH とキレート材の最適化.....	23
2-7-3 還元電位とスキャン速度及び時間依存性の最適化.....	25
2-7-4 $Cd^{2+}$ と $Pb^{2+}$ の検量線.....	27
2-8 結論.....	29
参考文献.....	30
<b>第 3 章 実試料分析における妨害物質の影響および前処理法の検討</b> .....	32
3-1 緒言.....	32

3-2 着想に至った経緯.....	32
3-3 工場排水に含まれる妨害物質.....	32
3-4 有機物の処理方法と想定される有機物の濃度.....	33
3-5 ASV 測定における有機物の分解方法.....	34
3-6 重金属の処理方法と想定される重金属とその濃度.....	35
3-7 ASV における $\text{Cu}^{2+}$ イオンの除去.....	36
3-8 試薬実験手順.....	39
3-8-1 紫外線による紫外線照射.....	39
3-8-2 陽イオン交換樹脂を用いた Cu イオンの除去.....	39
3-9 実験結果.....	40
3-10 結論.....	43
3-11 参考文献.....	44
<b>4 章 UBM カーボン薄膜を用いた、DNA に存在するメチルシトシンの簡便かつ高感度電気化学分析法の 開発.....</b>	<b>45</b>
4-1 緒言.....	45
4-2 メチルシトシンを測定する意義.....	45
4-3 どのメチルシトシンを測定すべきか? (Global methylation と Local methylation).....	47
4-4 バイサルファイト法以外の Local methylation を測定する方法.....	48
4-4-1 四酸化オスミウムを用いた方法.....	48
4-4-2 イムノアッセイ法.....	49
4-5 本研究への着想に至った経緯 (金属ナノ粒子に基づく電気化学的メチルシトシン検出).....	50
4-6 実験方法.....	55
4-6-1 実験試薬.....	55
4-6-2 PCR.....	55
4-6-3 電極の作製.....	55
4-6-4 ゲノム DNA の前処理(バイサルファイト処理、PCR、制限酵素処理).....	56
4-6-5 電気化学検出.....	58
4-6-6 電気泳動検出.....	59
4-7 結果と考察.....	59
4-7-1 メチル化・非メチル化 DNA の検量線.....	59
4-7-2 ゲノム中に存在する DNA のシトシンメチル化評価.....	61
4-9 終わりに.....	65
4-10 参考文献.....	66
第 5 章 総括.....	67
発表リスト.....	69
謝辞.....	72

# 第1章 序論

## 1-1 背景

重金属は、様々な製品に利用されている一方で、生物にとって有害な環境汚染物質でもある。重金属は、河川、海、地下水、土壌および底質など広範囲に分布し、それを食物や水と同時に体内に取り込むと、蓄積、濃縮する傾向があり、健康に重大なダメージを与える。とりわけ、カドミウム(Cd)、鉛(Pb)などの毒性が良く知られ、カドミウムの人体に対する影響は、イタイイタイ病(骨軟化症)であり、Pbの急性毒性の症状は四肢の麻痺などが知られている。我が国では、昭和30年代の高度経済成長により、生産規模が拡大し、都市化が進んだ。その結果として、水俣湾の水銀被害や神通川のカドミウムの被害が良く知られている。これら重金属の毒性の経験から、適切な処理が工場内で行われ、近年ではこのような重金属の被害の報告はない。しかしながら、カドミウムや鉛、水銀は、環境ホルモンの疑いがある物質として扱われるようになり、これらの重金属を検出し、健康被害を未然に防ぐことは重要である。

従来、重金属イオンの分析において、原子吸光分析(Atomic Absorption Spectrometry: AAS)<sup>[1]</sup>、誘導結合プラズマ発光分析(Inductively Coupled Plasma: ICP)<sup>[2]</sup>などが主に用いられている。これらの方法は、非常に高感度かつ高精度に信頼性の高い分析が可能である。しかし、装置自体が大型であるだけでなく、ランニングコストも高くなり、設備も要求されるため、オンサイト分析に適していない。今までに、オンサイト分析を行うために、比色法などの簡易重金属分析法が開発されてきたが、検出感度が低く定量性に課題がある。一方、電気化学的手法は、近年小型のポテンシオスタットも開発されており、オンサイト分析やオンライン測定に適している。特に、電気化学的手法の中でもアノードリックストリッピングボルタンメトリー (Anodic Stripping Voltammetry: ASV) 法は、溶液中の金属イオンを電極表面上に還元濃縮した後、再酸化する際の電流値を測定する方法で、ppt~ppb オーダーの分析が数分で可能であるため、短時間で高感度に検出可能な方法として知られている。ASV 測定に用いる代表的な電極として、水銀電極が作用電極として用いられてきた。しかしながら、水銀は有害であり、表面が酸化されてしまうため新しい表面を形成する必要があるため、小型のデバイス化には適していない。それゆえ、無毒で安価な電極の開発が求められている。そこで近年、ASV 用電極としてカーボン電極が注目されている。カーボン電極は、安価で毒性がないだけでなく、水素過電圧が大きく還元側に広い電位窓を有するため、様々な重金属の還元に適した電極である。カーบอนは様々な構造を有し構造によりその電気化学特性は大きく変化する。このため、様々なカーボン系電極を用いた重金属の分析法の開発が進められてきている。

## 1-2 重金属の応用とその毒性

重金属は、様々な製品に使用されているが、特に毒性の強いカドミウムと鉛の利用例について紹介する。カドミウムは、主にカドミウム/ニッケル電池の負極として使用されてきた<sup>[3]</sup>。しかしながら、現在では環境汚染が懸念され、より安定で出力の大きいリチウムイオン電池、ニッケル水素電池が登場するとカドミウムの使用は減少した。近年では蛍光性の持つカドミウム化合物はテレビのモニター材料として使用され、中性子の吸収しやすい性質から、原子炉の制御棒としても使用されている。また硫化カドミウムは半導体としても使用され、光電管、高電子倍増管として使用されている。しかしながら、これらのカドミウムが何らかの事態で溶解し、微量でも体内に蓄積されると、イタイイタイ病(骨軟化症)となる。

一方鉛は、アンチノック材として車のガソリンの添加材に使用されていた<sup>[4]</sup>。鉛の毒性は、嘔吐、下

痢、肝障害、排尿障害などを起こす。その毒性のため、近年使用されなくなっている。しかしながら、鉛は現在でも鉛蓄電池として自動車のバッテリーに使用されている<sup>15)</sup>。カドミウムと鉛は、環境ホルモンの疑いがある物質として扱われるようになり、様々な毒性の高い重金属の規制が行われている。下記の表 1-1 に世界保健機関 (WHO)の定める飲料水の基準と環境省の水質基準を示す。

表 1-1 WHO の定める飲料水の基準<sup>16)</sup>と環境省の定める水質基準 (環境省 HP より)

重金属 (ppb)	WHO	日本
カドミウム (Cd)	3	3
鉛 (Pb)	10	10
クロム (Cr)	50	50
水銀 (Hg)	6	5
銅 (Cu)	2000	1000
亜鉛 (Zn)	※	1000
ヒ素 (As)	10	10

※飲料水中から検出される濃度では健康上の懸念はない

### 1-3 従来の重金属の分析法

上記の重金属を分析する様々な技術が確立されてきている。そこで、最も代表的な重金属分析の例として、沈殿反応を利用した分析、原子分光分析、蛍光 X 線分析、比色分析、電気化学分析について紹介する。

#### 1-3-1 沈殿反応を利用した系統分析

金属イオンの系統分析とは、ある溶液に入っている未知のさまざまな金属イオンを、沈殿など反応を利用することで分離し検出する方法である。(図 1-1) 有毒金属であるカドミウムイオンや鉛イオンは、硫化物イオンや塩化物イオンといった陰イオンを反応させることで沈殿する性質を利用して検出する。しかしながら、塩酸の使用や硫化水素を使用する必要があり、分析操作も煩雑であるためオンサイト分析には適していない。

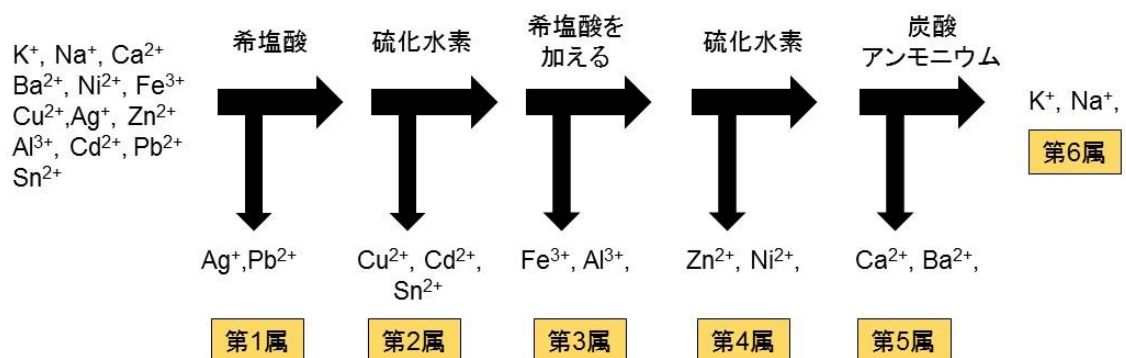


図 1-1 イオンの系統分離

### 1-3-2 原子吸光分析法 (Atomic Absorption Spectrometry: AAS)、および誘導結合プラズマ法(Inductively Coupled Plasma: ICP)による分析

AAS<sup>[1]</sup>と誘導結合プラズマに基づく分析(ICP-Optical Emission Spectrometry: ICP-OES, ICP-Mass Spectrometry: ICP-MS)<sup>[2]</sup>の関係を図 1-2 に示す。原子吸光分析は、測定試料を加熱して測定元素を原子化し、ターゲット元素に特有の波長の光で基底状態の励起状態に遷移する。この時の光の吸収度から元素の濃度を測定する方法である。ICP-OES は、高周波誘導結合プラズマを利用する分析法である。試料溶液を霧状にして Ar プラズマ中に導入し、プラズマ内で励起された元素が基底状態に戻る際の発光を分光して元素の定性を行い、光の強度から定量を行う方法である。ICP-MS は質量分析計を使用するため、ppt レベルの分析が可能な方法である。これらの方法は、現在最も信頼性ある有力な方法として公定法に定められ、幅広く使用されている。しかしながら、前処理による目的金属の濃縮を必要とし、試料調整により分析結果に大きく左右する事が知られており、操作を習熟する必要がある、大型の装置を必要とするため、オンサイト分析には適していない。

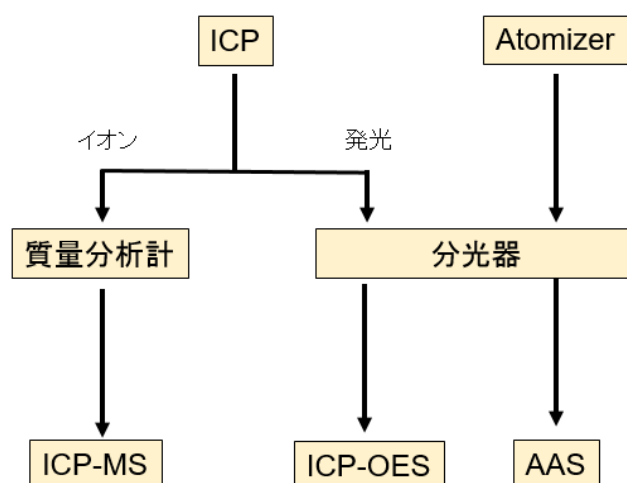


図 1-2 原子吸光分析と誘導結合プラズマ発光分析の関係

### 1-3-3 蛍光 X 線分析 (Fluorescent X-ray analysis)

蛍光 X 線分析は、照射した X 線が原子の内殻電子を外殻に叩きだし、空孔に外殻電子に戻る際に、余ったエネルギーが光エネルギーとして発散される蛍光 X 線を利用する方法である<sup>[7]</sup>。蛍光 X 線は、元素固有エネルギーを有するため定性できる。蛍光 X 線も ICP 発光分析同様、試料中の元素を励起させ情報を得るが、ICP 発光分析は外殻電子が励起されるのに対して、蛍光 X 線分析は内殻電子の励起することが特徴である。ICP 発光分析はネブライザーで霧状にする必要があり、また装置も大型であるが、一方 X 線蛍光分析は、サンプルを破壊することなく小型の装置で分析が可能であり前処理が不要であるが、準定量性である事が欠点である。



### 1-3-4 比色分析

近年、重金属を簡易に分析するために、小型の蛍光 X 線分析装置といった重金属分析方法が開発されている。一方、簡易分析法として、吸光光度法がある。現在、吸光光度法に使用する光学系機器は広く普及し、小型なものが市販されている<sup>[8]</sup>。また測定対象の重金属と錯体を形成し、発色あるいは変色する Cr<sup>[9]</sup>, Cu, Fe, Ni<sup>[10] [11]</sup>の指示薬が開発され、図 1-3 に示すような簡易分析方法として現在使用されている。しかしながら、基準値がより厳しい Cd と Pb 分析において良い比色試薬が開発されておらず、電気化学分析で測定されているのが現状である<sup>[11]</sup>。

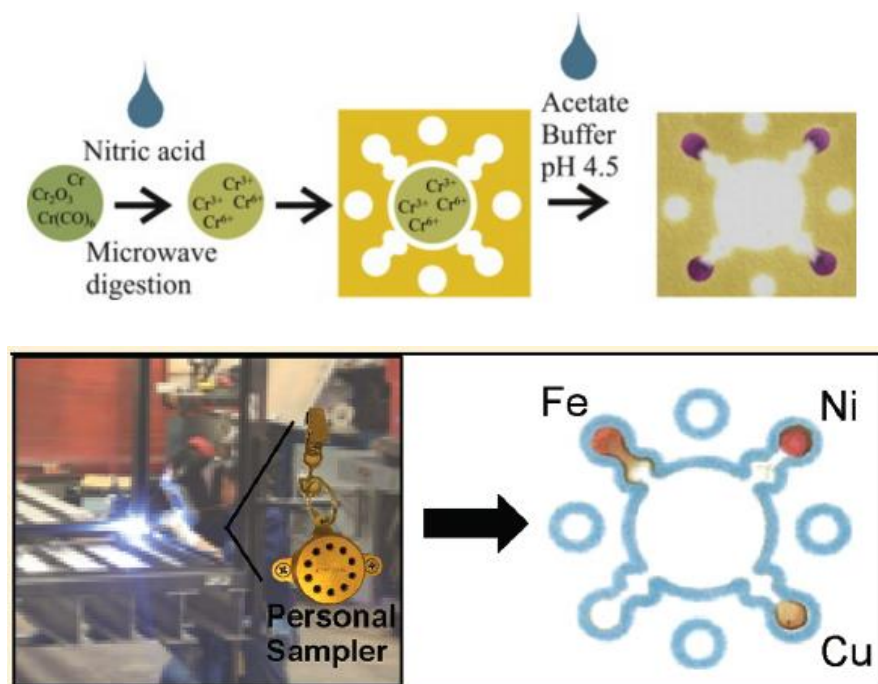


図 1-3 Cr<sup>[9]</sup>, Cu, Fe, Ni<sup>[10] [11]</sup>の比色分析

### 1-3-5 電気化学分析 (アノードックストリッピングボルタンメトリー: ASV 法)

ボルタンメトリーとは電極の電位を変化させ流れる電流を測定する方法の総称である。ボルタンメトリーの 1 つであるサイクリックボルタンメトリー法 (Cyclic Voltammetry: CV 法)は、化合物やイオンの酸化還元特性を知るための電気化学測定として用いられるが、溶液中の電気化学活性種が直接電極に到達した時に観測される電流を信号としているため、検出下限が  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$  (分子量が 100 の場合は 1 ppm) 程度が限界であり微量分析は不可能である<sup>[12]</sup>。

しかしながら、ボルタンメトリーの一種として、ASV 法という手法が知られている。ASV 分析の原理は、まず溶解している重金属イオンを、マイナスの電位をかけることによって電極上に析出させる。次に電極の電位をプラス方向に走査させながら再び重金属イオンとして再酸化させる。溶出時の電位から物質を同定し、得られる電流量から重金属イオンを定量する。この方法は、電極上に目的金属を短時間で濃縮し、一挙に酸化するため大きな電流値が得られる。その結果、非常に高感度であり、数分で ppt ~ppb オーダーの分析が可能な方法である<sup>[12]</sup>。以下、ASV 測定で使用されてきた水銀電極について紹介する。

### 1-3-5-1 吊下げ水銀電極 (Hanging Mercury Drop Electrode: HMDE)

水銀滴を保持した状態で電極として使用する。以前では、ASV を用いて微量金属イオンの定量法の多くにこの HMDE が用いられた。低濃度測定が可能であると同時に、水銀滴の交換が容易であるため、常に新しい電極表面が準備出来るため高い再現性が得られることが知られている。

### 1-3-5-2 水銀薄膜電極 (Mercury Film Electrode: MFE)

白金電極や炭素電極など基板となる電極に、水銀 ( $\text{Hg}^{2+}$ ) を含む水溶液中で、水銀を析出させた後、電極として使用方法である。HMDE と同様の測定が可能であるが、ASV で使用した際、目的の重金属が電極内に拡散する時間が小さくなるため、HMDE での ASV に比べて感度が高くなると報告されている。一例として MFE によって、 $\text{Cd}^{2+}$  では  $5 \times 10^{-12} \text{ M}$  (0.0006 ppb)、 $\text{Pb}^{2+}$  では  $8 \times 10^{-12} \text{ M}$  (0.002 ppb) の検出下限を達成している<sup>[13]</sup>。

## 1-4 ASV の利点と課題

以上に述べてきた重金属の測定法の中で、ASV 法は、ICP-MS、AAS などの機器分析と比較して、はるかに小型簡便である。一方、より簡便な比色法と比較すると、定量性と検出限界に優れているため、オンサイト分析の手法として有力である。しかしながら、現在使用している水銀電極は、毒性が高く、かつ水銀は液体であることから、小型化には限界がある。一方、医療関係の電気化学センサに目を向けると、自己血糖管理用のセンサは、手のひらサイズで、使い捨ての印刷電極を用いており、家庭でも使用できる価格と簡便性を有している<sup>[14]</sup>。より、簡便で毒性のない電極として、近年、イリジウム(Ir)<sup>[15]</sup>、金(Au)<sup>[16]</sup>、銀(Ag)<sup>[17]</sup>、ビスマス(Bi)<sup>[18]</sup>などの固体電極が水銀電極の代替電極として ASV 法の電極として検討されてきており、一部は実用化されている。図 1-4 に示すようにカーボン電極は、水素過電圧が大きいため、還元側に広い電位窓を有し析出電位の異なる様々な重金属の析出に適している。化学修飾電極 (Chemically Modified Electrodes : CME)<sup>[19] [20]</sup> も多数開発されておりが使用されてきたが、再現性のある測定のためには電極作製に習熟する必要があるが課題として残っている。一方、最近、ボロンドープダイヤモンド(BDD)やカーボンナノチューブ(CNT)、グラフェンなどの新しいカーボン材料を ASV 分析に応用する研究が数多く報告され、検出限界などで優れた性能を有する電極が開発されつつある。これらの電極を用いることで、オンサイト分析に適した簡便安価な ASV 装置の開発が期待されている。

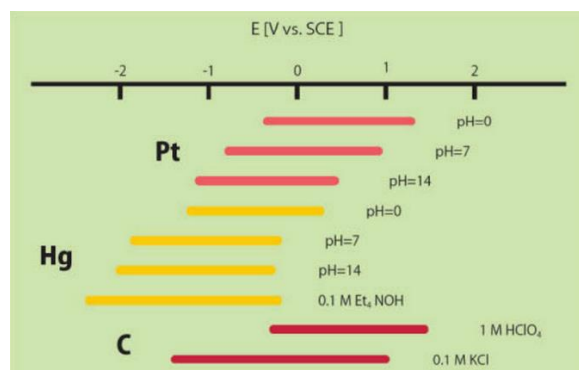


図 1-4 金属電極とカーボンの電位窓  
藤嶋昭, 相澤益男, 井上徹, (電気化学測定法より参照)

### 1-5 ASV 法のバイオ分析への応用

ASV 分析は、重金属の検出に極めて検出限界に優れ、その操作の簡便性により、環境中の重金属分析のみならず、遺伝子やたんぱく質、疾病マーカーなどのバイオセンシングに応用される様になってきている<sup>[21] [22] [23]</sup>。金属ナノ粒子には、複数の重金属原子が含まれているため、それを溶解し、イオン化して、ASV 分析することで、かなりの信号増幅を行うことができる。たとえば、J. Wang らは、硫化カドミウムのナノ粒子を DNA に標識し、カドミウムイオンに由来する酸化電流を計測することで、ターゲット DNA を 100 fmol まで検出でき、高い再現性 (R.S.D.=6%) 達成している<sup>[24]</sup>。このように金属ナノ粒子を電気化学バイオ分析の標識に応用することで、簡便かつ高感度なバイオセンサの実現が期待できる。

## 1-6 本論文の目的

以上述べてきた背景により、安全、安価な電極材料を用いた環境中の重金属の定量、さらには、そのバイオ応用などへの展開が期待されている。そこで、本論文では、以上の目的に対して以下の3点について研究を行った。

- ① カーボン薄膜において、 $sp^2$ 結合と $sp^3$ 結合の割合が重金属分析の性能に与える影響について明らかにし、より低濃度まで検出できる重金属分析を目的とした。
- ② カーボン電極を用いた電気化学分析法はオンサイト分析に適しているが、実試料分析に応用する場合、溶存する有機物や競合イオンが妨害となる。実試料サンプルでも測定できるように、溶存の有機物や競合イオンの妨害の影響を調べ、より簡便なシステムに適した前処理法を開発し、実試料に模したサンプルでその効果を実証することを目的とした。
- ③ 重金属のナノ粒子は、生体分析の検出マーカーとして用いることで、電気化学信号を増感することができる。2章で開発した $sp^2/sp^3$ ハイブリットカーボン薄膜電極を用いて、DNA中に存在するメチルシトシンをピンポイントで検出できる簡易分析法を実現することを目的とした。

## 1-7 本論文の構成

第1章では、重金属の産業への応用例とその毒性についてまとめた。重金属を測定する意義と従来法について整理し、電気化学的手法の一つである ASV 法が、重金属の簡易分析法として最も適している事を示した。また、従来の ASV 法の課題である水銀電極を用いた測定について示した。更に、この背景を踏まえ本研究の目的を示し、本研究における論文の構成を示した。第2章で従来のカーボン電極とその性能について整理し、本論文で開発したカーボン薄膜材料の特性と比較検討を行った。具体的には、検出限界向上のため、重金属の測定条件の最適化および  $sp^2/sp^3$  比の影響について検討した。第3章では、工場排水の分析で想定される、妨害物質の影響と前処理方法について検討し最適化を行った。さらに、実試料を模したサンプルで実証した。第4章では、第2章で検討した重金属測定方法を応用して、重金属のナノ粒子を増感作用のある検出マーカーとして使用し、DNA 中に存在するメチルシトシン検出への応用を行った。最後に5章では本研究を総括し、今後の展望についてまとめた。

## 1-8 参考文献

- [1] A. Pereira Lde, I. G. de Amorim, J. B. da Silva, *Talanta* **2004**, 64, 395-400.
- [2] M. G. Minnich, D. C. Miller, P. J. Parsons, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2008**, 63, 389-395.
- [3] J. David, *J. Power Sources* **1995**, 57, 71-73.
- [4] J. A. Lee, *Nature* **1972**, 238, 165-166.
- [5] H. Bode, *Lead-acid batteries*, **1977**.
- [6] 社团法人日本水道協会, *Guidelines for drinking-water quality* **2004**.
- [7] A. Prange, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **1989**, 44, 437-452.
- [8] H. Yanagisawa, R. Kurita, T. Yoshida, T. Kamata, O. Niwa, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, 221, 816-822.
- [9] P. Rattanarat, W. Dungchai, D. M. Cate, W. Siangproh, J. Volckens, O. Chailapakul, C. S. Henry, *Anal. Chim. Acta* **2013**, 800, 50-55.
- [10] M. M. Mentele, J. Cunningham, K. Koehler, J. Volckens, C. S. Henry, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 4474-4480.
- [11] P. Rattanarat, W. Dungchai, D. Cate, J. Volckens, O. Chailapakul, C. S. Henry, *Anal. Chem.* **2014**, 86, 3555-3562.
- [12] J. Buffle, M. L. Tercier-Waeber, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2005**, 24, 172-191.
- [13] E. Fischer, C. M. G. van den Berg, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 385, 273-280.
- [14] J. Wang, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 814-825.
- [15] J. Herdan, R. Feeney, S. P. Kounaves, A. F. Flannery, C. W. Storment, G. T. A. Kovacs, R. B. Darling, *Environmental Science & Technology* **1998**, 32, 131-136.
- [16] R. W. Andrews, D. C. Johnson, *Anal. Chem.* **1975**, 47, 294-299.
- [17] E. Kirowa-Eisner, M. Brand, D. Tzur, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 385, 325-335.
- [18] I. Švancara, C. Prior, S. B. Hočevar, J. Wang, *Electroanalysis* **2010**, 22, 1405-1420.
- [19] G. G. Wildgoose, C. E. Banks, H. C. Leventis, R. G. Compton, *Microchim Acta* **2006**, 152, 187-214.
- [20] J.-M. Zen, A. Senthil Kumar, D.-M. Tsai, *Electroanalysis* **2003**, 15, 1073-1087.
- [21] J. Wang, D. Xu, A. N. Kawde, R. Polsky, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5576-5581.
- [22] L. Authier, C. Grossiord, P. Brossier, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4450-4456.
- [23] H. Cai, Y. Xu, N. Zhu, P. He, Y. Fang, *Analyst* **2002**, 127, 803-808.
- [24] J. Wang, G. Liu, R. Polsky, A. Merkoçi, *Electrochem. Commun.* **2002**, 4, 722-726.

## 第 2 章 アンバランスドマグネトロンスパッタ法で作製したカーボン薄膜を用いたカドミウム及び鉛の簡便かつ高感度分析法の開発

### 2-1 はじめに

重金属イオンは、世界中の至る所で、その危険性が指摘されている。とりわけ、毒性の高い  $\text{Cd}^{2+}$  や  $\text{Pb}^{2+}$  の分析は極めて重要であり、WHO の飲料水質ガイドラインでは、 $\text{Cd}^{2+}$  については 3 ppb、 $\text{Pb}^{2+}$  については 10 ppb 以下であることが求められている<sup>[1]</sup>。これらの重金属の検出は、AAS や ICP 発光分析が広く用いられている。本論文では、より簡便で高感度な重金属の電気化学的分析法の開発を目的とした。1 章で述べたように、重金属分析の ASV 測定で使用される電極には水銀電極が用いられてきたが、その高い毒性のため、近年では還元側に電位窓の広く、様々な金属を電極に還元できるカーボン素材に注目され測定電極として研究されている。まずは、以下に従来のカーボン素材を分類し、その特徴と ASV 分析への応用について紹介する。

### 2-2 グラファイト型カーボン電極 ( $\text{sp}^2$ )

カーボンはグラファイト型( $\text{sp}^2$  カーボン)とダイヤモンド型のカーボン( $\text{sp}^3$  カーボン)に分類できる。従来の  $\text{sp}^2$  カーボン材料の中で、カーボンペースト、高配向熱分解黒鉛(Highly Oriented Pyrolytic Graphite : HOPG)、グラッシーカーボン電極(Glassy carbon: GC) が電極として広く用いられている。カーボンペースト電極は、ワックス、エポキシ、シリコンゴム、オイルなどの中に、グラファイト粉末を複合化したものである。印刷技術によって、基板上にパターニングができるため、小型のセンサの電極として使用されている。しかしながら、貴金属に比べ測定の再現性などが劣る事が知られている<sup>[2]</sup>。HOPG 電極は、高温で減圧した条件で、炭化水素を熱分解して作製したもので、基板上に結晶が配向したカーボンである。グラファイトの構造を図 2-1 に示す。エッジ面は、電気化学的活性点として知られ、高い電気活性を示す事が報告されているが、高い容量性電流を示す事が知られている。一方、ベール面は表面の平坦性が高いために低い容量性電流を示す事が知られている<sup>[3][4]</sup>。また、GC 電極は、熱硬化性樹脂を 1000～1500℃で熱処理する事によって炭素化して作成され、電気伝導性、耐化学薬品である事が知られている<sup>[3-4, 5][4b, 6]</sup>。図 2-2 は、GC の構造の模式図を示す<sup>[7]</sup>。HOPG とは異なり、結晶構造を持たない非結晶であり、電気化学的測定用の作用電極として広く用いられている。しかしながら、上記  $\text{sp}^2$  結合を多く含む電極では、+1.5 V よりも貴もしくは、-1.0 V よりも卑な電位で酸化あるいは還元される電気化学マーカーの検出は困難になる<sup>[5]</sup>。そのため、電位窓が広く、低い容量性電流を有する電気化学特性を示す電極が求められている。

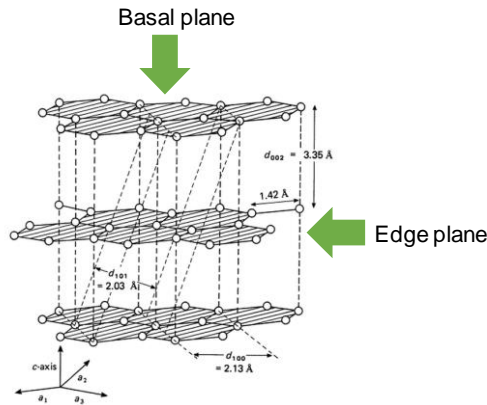


図 2-1 グラファイト構造におけるエッジ面とベーサル面<sup>[8]</sup>

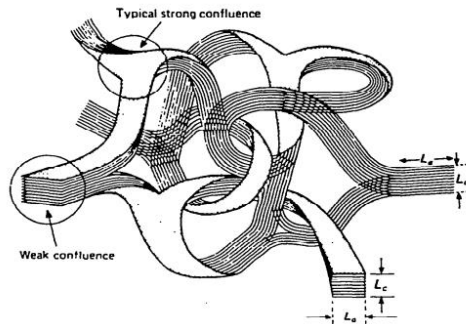


図 2-2 GC の構造模式図 (Jenkins Model) <sup>[7]</sup>

### 2-3 ダイヤモンド電極 (sp<sup>3</sup>型電極)

ボロンドープダイヤモンド (Boron Doping Diamond: BDD) 電極は、Swain ら、Fujishima、Einaga ら、Compton らのグループにより電気化学的測定用の電極として、環境物質の測定や、バイオセンシングに応用されてきた<sup>[9] [10] [11] [12] [13] [14]</sup>。BDD 電極は、絶縁体であるダイヤモンドに電気伝導性を持たせるために、ホウ素をドーピングしたダイヤモンドである。sp<sup>2</sup> 結合を多く含むカーボン電極に比べて電位窓が広く、様々な酸化還元種の測定に適している。感度が低い課題点もあるが、ノイズの原因となる容量性電流が極めて低いため S/N が向上し、低濃度検出が実現できる。また、ダイヤモンド構造を有するため、化学的に安定な表面であり耐久性に優れ、再現性のある電極であることも知られている。このように BDD は、優れた電極材料であるが、通常 700℃前後の高温で作製されるため、プラスチックなどにパターニングする事が困難である。



## 2-4 $sp^2/sp^3$ 複合カーボン薄膜電極

### 2-4-1 ダイヤモンドライクカーボン (Diamond Like Carbon: DLC)

DLC は、図 2-3-1 に示すようにダイヤモンドとグラファイトの両方の結合を併せ持つ炭素を主成分としたカーボン薄膜の総称である。図 2-3-2 に示すように、 $sp^3$  の比率が多くなるに従いダイヤモンドに似た物性となり、 $sp^2$  の比率が多くなるに従いグラファイトに似た物性となる、その比率を調整することで、様々な特性をもつカーボンを作製する事が可能である。また、 $sp^2$  結合と  $sp^3$  結合の他に、水素の含有量を調整することで物性をさらに変えることが可能である。図 2-3-2 に示すように一般的に水素含有量が多くなると、より高分子的な物性になると知られ、電気伝導性は低下する<sup>[15]</sup>。 $sp^3$  結合を多く複合した DLC は、高硬度、低摩擦係数、化学的不活性、耐食性を示すため、主に CD の保護膜として使用されている。電気伝導性は、 $sp^3$  結合が増えるにしたがって低下するが、逆に DLC 中の  $sp^2$  結合を多く複合させるに従い電気伝導性を示すため、電気化学分析の電極として使用されてきている。以下に分析電極として使用されている DLC について紹介する。



図 2-3-1 ダイヤモンドと DLC と黒鉛（グラファイト）の構造

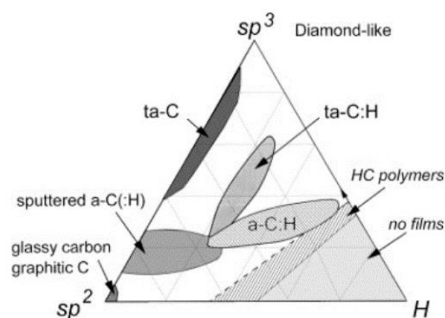


図 2-3-2  $sp^3/sp^2/H$  の比率と DLC の特性の相関図 <sup>[15]</sup>

## 2-4-2 電子サイクロトン共鳴スパッタ法で作製したカーボン薄膜

Hirono らは、電子サイクロトン共鳴 (Electron cyclotron resonance: ECR) スパッタ法により作製したカーボン薄膜 (ECR ナノカーボン薄膜) を報告している。図 2-4 に ECR スパッタ装置の模式図を示す<sup>[16]</sup>。ECR スパッタ装置のプラズマ発生原理は、磁界強度 87.5 mT の磁力線内を回転する電子を、2.45 GHz の交流電界で共振させ高速回転させる。その電子とアルゴンガス分子を衝突させる事で、プラズマを発生させる。生成されたプラズマが、カーボンターゲットをスパッタし、基板の上に、スパッタされたカーボンが堆積する。この時、基板の形状に依存した成膜が可能であり、例としてシリコンウエハ上で作製すると、原子レベルで平坦なカーボン薄膜の製膜が可能である。X 線電子分光法 (X-ray Photoelectron spectroscopy: XPS) を用いた方法で  $sp^2/sp^3$  結合比を確認した。図 2-5 に示すように ECR ナノカーボン薄膜は、 $sp^2$  結合と  $sp^3$  結合が複合している。また、図 2-6 に ECR ナノカーボン薄膜と、一般的に  $sp^3$  結合の多い DLC の透過電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope: TEM) 像を示す<sup>[17]</sup>。Niwa らはこの ECR ナノカーボン電極は、一般的なアモルファスカーボンとは異なり、 $sp^2$  の微結晶を含むカーボン薄膜であることのみならず、 $sp^3$  結合の多い DLC に比べて、高い電気伝導性を示すカーボン薄膜である<sup>[17]</sup>。また電気化学的特性として、BDD とほぼ同等の広い電位窓、低い容量性電流も有するカーボンである<sup>[18]</sup>。

以上の特性により、ECR カーボン薄膜電極では、従来のカーボン薄膜では高感度測定が困難であるピリミジン塩基を、定量的に検出する事に成功している<sup>[19]</sup>。また、栗田等は還元側に電位窓が広い事を応用して、水中のカドミウムの高感度分析に応用し、<sup>[20]</sup> 従来電極である GC 電極と比較して約 1 桁の検出下限を向上する事に成功している。ECR ナノカーボン薄膜は、電気化学分析電極として非常に優れたナノカーボン材料であることのみならず、常温で成膜が可能であり、プラスチック基板など有機ポリマーの素材にも製膜が可能であるため、センサ用電極としても期待されている。

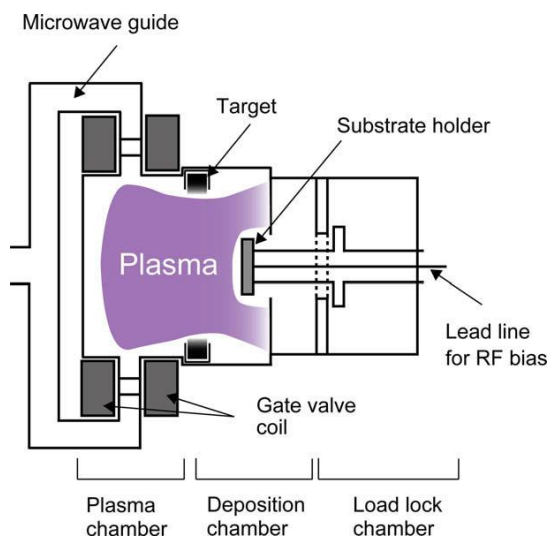


図 2-4 ECR スパッタ装置の概略図<sup>[16]</sup>

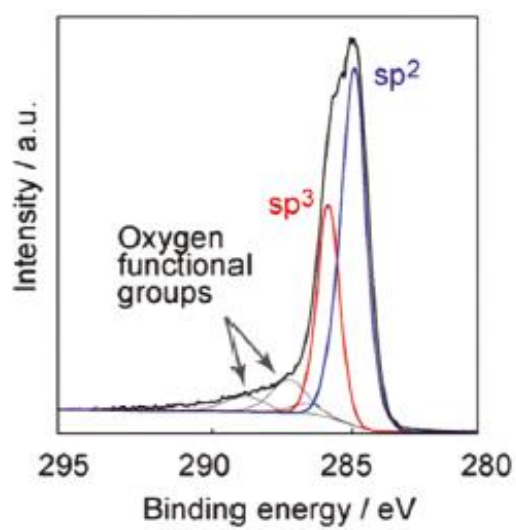


図 2-5 ECR ナノカーボン薄膜の XPS データ<sup>[17]</sup>

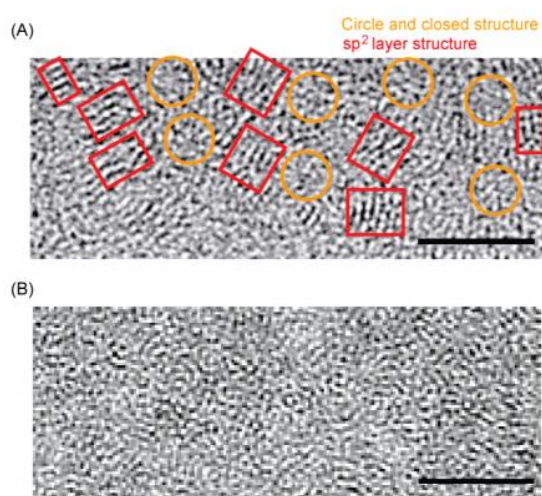


図 2-6 (A) ECR ナノカーボン薄膜と(B) DLC 膜の TEM 像(Scale bar = 5 nm) <sup>[17]</sup>  
赤:  $sp^2$  結合、オレンジ:  $sp^3$  結合を示す。

### 2-4-3 アンバランスドマグネトロンスパッタカーボン薄膜

前述で説明した、ECR ナノカーボン薄膜は、電気化学分析電極として非常に優れた材料である。ECR スパッタ装置は、リング状の特殊なカーボンターゲットを必要とし、一般的なスパッタ法よりも成膜効率が悪く、また従来のスパッタ装置の中でも非常に高価である。近年、鎌田等は、ECR スパッタ装置よりも装置が低価格で、高効率で作製できるアンバランスドマグネトロン(Unbalanced magnetron: UBM) スパッタ装置を用いたカーボン膜電極を開発した<sup>[21]</sup>。UBM 装置の概略図を図 2-7 に示す。UBM スパッタ装置は、内外の磁極のバランスを崩すことで外側磁極からの磁力線の一部が成膜基板上まで伸ばすことが可能な成膜方法である。成膜基板に到達するイオン量を増大させる事が可能になり、プラズマによるエッチング効果を利用できる。鎌田等は、様々な条件を変えてカーボン薄膜作製し、ECR ナノカーボン薄膜とほぼ同じ性能のカーボン薄膜の作製に成功した<sup>[21]</sup>。この UBM スパッタ装置は、基板とターゲットがほぼ並行に設置しているので、成膜効率も良く、またイオン照射電圧を変える事で  $sp^2$  結合と  $sp^3$  結合の割合を変える事に成功している。以上の様に、新規電極材料の中で UBM ナノカーボン薄膜は、優れた電気学特性を示し、低温での薄膜形成が可能なため、広範囲で利用できるカーボン素材として期待できる。

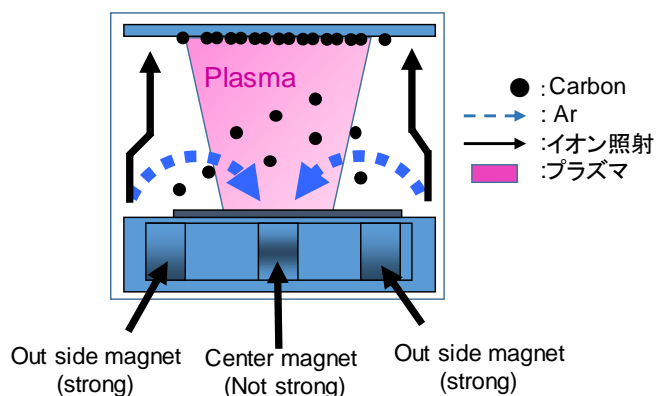


図 2-7 UBM スパッタ装置の概略図

## 2-5 着想に至った経緯

UBM ナノカーボン薄膜は、優れた電気化学特性と薄膜カーボンである為、広範囲で使用できるカーボン素材である事を 2-4 で紹介した。このカーボン薄膜を ASV に応用することで、 $\text{Cd}^{2+}$  と  $\text{Pb}^{2+}$  の低濃度検出が可能になると考えた。以下に着想に至った経緯を述べる。

表 2-1 はこれまでの重金属分析における様々なカーボン電極の報告をまとめたものを示す。カーボン材料の構造は、グラファイト結合( $\text{sp}^2$  結合)とダイヤモンド結合( $\text{sp}^3$  結合)に大きく分けられる。 $\text{sp}^2$  結合が豊富なカーボン電極は、シグナル電流も大きいノイズ電流も大きく、 $\text{sp}^3$  結合が豊富なカーボン電極のノイズ電流は小さいがシグナル電流も小さい傾向にある。もし、シグナル電流を保持しつつノイズ電流を抑制できるカーボン電極ができれば、重金属の高感度分析が期待できる。近年  $\text{sp}^2$  結合と  $\text{sp}^3$  結合が複合した ECR カーボン薄膜が開発され、ASV 法に適用した結果、従来電極である GC 電極よりも 1 桁低い  $\text{Cd}^{2+}$  の検出下限に成功している<sup>[20]</sup>。このカーボン電極の  $\text{sp}^2:\text{sp}^3$  結合は、60:40 であり、金属の還元  $\text{sp}^2$  結合をより複合させる事で、感度が向上し、より低濃度の分析が可能になると期待した。しかし、 $\text{sp}^2$  と  $\text{sp}^3$  結合が複合したカーボン薄膜において  $\text{sp}^2$  結合と  $\text{sp}^3$  結合の比率が ASV において、どのように影響するかの研究例は今までに無く、実際に検証する必要がある。

本研究では、ECR 法よりも安価で成膜効率の良い UBM スパッタ法を用いて、 $\text{sp}^3$  と  $\text{sp}^2$  の複合比率を変えたナノカーボン材料を作製し、重金属の ASV 測定を行った。まず、測定溶液の最適化を錯形成安定度定数と水素過電圧の観点から行った後、 $\text{sp}^2$  結合と  $\text{sp}^3$  結合が ASV においてどのように影響するかを明らかにすること及び、最適化した条件で、Cd と Pb 分析の検出限界向上を目的とした。

表 2-1 様々な電極におけるカドミウムイオンの ASV 測定の  
感度、BG 電流、及び検出下限

Electrode	$\text{sp}^2 : \text{sp}^3$	Signal current $\mu\text{A cm}^{-2} (\mu\text{g L}^{-1})^{-1}$	Background current $\mu\text{A cm}^{-2}$	Detection limit $\mu\text{g L}^{-1}$
Graphite <sup>[22]</sup>	100 : 0	11.0	663.4	10
Carbon nanotube <sup>[23]</sup>	100 : 0	0.8	198.1	1.1
Glassy carbon <sup>[20, 24],[25]</sup>	100 : 0	2.7	160	5
ECR- nanocarbon <sup>[20]</sup>	60 : 40	1.0	5.3	0.3
UBM- nanocarbon <sup>[25]</sup>	50 : 50	0.47	20	0.5
DLC (Pure) <sup>[26]</sup>	-	28	350	-
DLC (N-dope) <sup>[27]</sup>	-	-	about 12	-
BDD (Renault) <sup>[28]</sup>	0 : 100	0.0042	0.012	0.05
BDD (Swain) <sup>[29]</sup>	0 : 100	0.074	2.7	1

## 2-6 実験方法

### 2-6-1 使用試薬及び材料

本章および以後の章において、ASV測定におけるすべての試薬は、分析化学用の高純度品を使用し、超純水製造装置 (Millipore製) から得た超純水を用いて調製した。

- ・ 1.00 mg/ml カドミウム (原子吸光用、ナカライテスク製)
- ・ 0.100 mg/mlの鉛 (原子吸光用、ナカライテスク製)
- ・ 0.2 mol/Lの酢酸緩衝液 pH 5.0 (ナカライテスク製)
- ・ フェリシアン化カリウム (和光純薬製)
- ・ クエン酸三ナトリウム二水和物 (和光純薬製)
- ・ 酢酸ナトリウム (和光純薬製)
- ・ 塩化カリウムは、(関東化学株式会社製)
- ・ エチレンジアミン四酢酸銅(II)二ナトリウム塩四水和物(EDTA、東京化成工業製)
- ・ ヘキサアンミンルテニウム塩化物(III) (Aldrich製)
- ・ グラッシーカーボン電極 (GC-20SS、片面鏡面、東海カーボン製)

### 2-6-2 UBM スパッタナノカーボン薄膜の形成

UBM ナノカーボン薄膜は、UBM スパッタ装置 (USP 330、ユニバーサルシステムズ)を用いて室温で製膜し、焼結カーボンをカーボンターゲットとして使用した。製膜基板として、低抵抗シリコン上は(結晶軸: 100、厚さ 400  $\mu\text{m}$ 、低効率:  $<0.02 \Omega\text{cm}^2$ )上に薄膜 40 nm で堆積した。スパッタ装置内のアルゴン圧力は  $6.0 \times 10^{-1} \text{ Pa}$  で成膜し、バイアス電圧基板をそれぞれ 20, 75, 100 V に変えた UBM ナノカーボン薄膜を作製した。UBM ナノカーボン薄膜と GC 電極の  $\text{sp}^3/(\text{sp}^2+\text{sp}^3)$ は、XPS ( Kratos Axis Ultra 製) の 284.5 eV ( $\text{sp}^2$ ) and 285.5 eV ( $\text{sp}^3$ )のピーク面積から決定した。図 2-8 に XPS の解析データを示す。これらの UBM ナノカーボン電極は UBM(80: 20)、UBM (64: 36)及び UBM (50: 50)と以後記述し、括弧内の数字は  $\text{sp}^2$ :  $\text{sp}^3$ を示す。

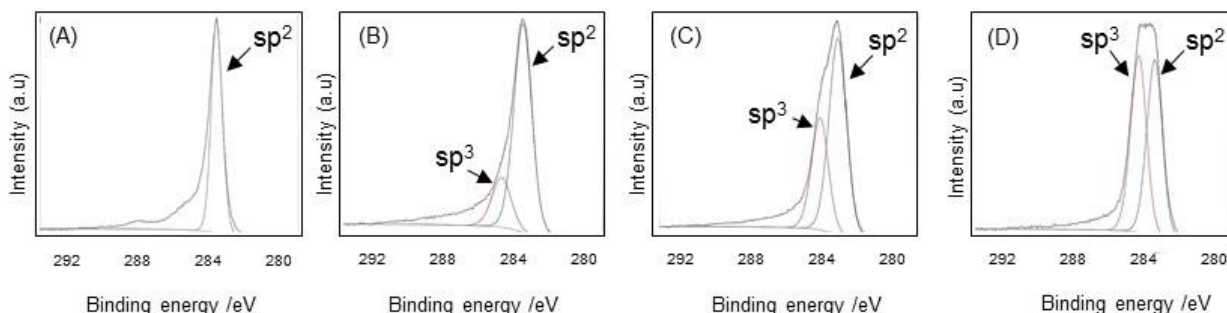


図 2-8 様々な UBM ナノカーボン薄膜とグラッシーカーボン電極の XPS データ

(A) GC, (B) UBM 20 V, (C) UBM 75 V, (D) UBM 100 V

※UBM の後の数字は作製時のイオン加速電圧を示す。

### 2-6-3 UBM ナノカーボン薄膜の作製方法

2-6-2で作製したUBMナノカーボン薄膜は、横: 約3 mm、縦: 約10 mm にダイヤモンドカッターで切断し、その上に、直径2 mmの穴の開いた絶縁テープを張り円盤状電極として使用した。(0.0314 cm<sup>2</sup>) (図2-9) GC 電極は、UBM ナノカーボン薄膜電極と同じサイズになるようにダイシングソーで切断し、使用前に、直径0.05 μmの酸化アルミナで研磨してから使用した。

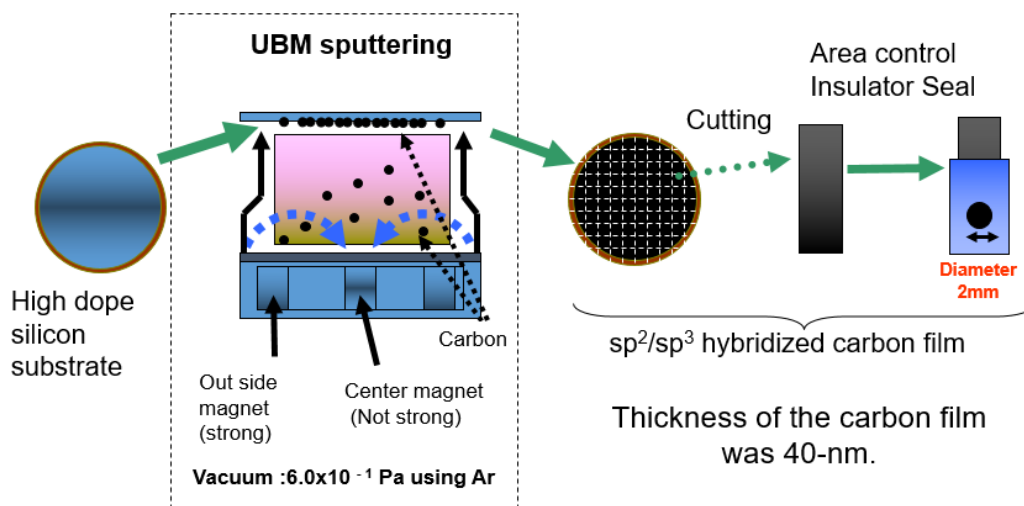


図 2-9 UBM ナノカーボン薄膜の作成方法

### 2-6-4 サイクリックボルタンメトリー法 (Cyclic Voltammetry: CV 法)

Ru(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>3+/2+</sup> と Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> のCV測定は、0.1mMの1M KCL溶液中で行った。掃引速度は、それぞれ0.1 V/s で行った。

### 2-6-5 重金属の電気化学分析

電気化学アナライザ(Model 660C, CH Instruments, Austion, TX)を使用した。図 2-10-1 に示すようにバッチ式の三電極式で測定を行い、作用電極には、上記で述べた UBM または、GC 電極を使用し、対向電極にはプラチナ(Platinum: Pt)、参照電極(Ag/AgCl)を使用した。実際に行った測定条件を図 2-10-2 に示す。再酸化してモニタリングする際には、矩形波ボルタンメトリー(SWV)法を採用した。SWV 法は、図 2-10-2 示すよう波形の電位を電極に印加し、フォワード電流値(i<sub>f</sub>)とリバース電流値(i<sub>r</sub>)を記録し、その差(i<sub>f</sub>-i<sub>r</sub>)を測定する。二つの電流値の差を測定するため、効率的にノンファラデー電流を除去でき、その結果、微分パルスボルタンメトリー法と同程度の検出下限を実現できる。検出下限は 1×10<sup>-8</sup> M ~ 1×10<sup>-4</sup> M (分子量が 100 の場合は 0.01~10000 ppb) 程度<sup>[30]</sup> まで測定が可能であり、CV 法よりも低い検出下限を達成できる。SWV 法は、パルスの印加を周波数で制御しているために、微分パルスボルタン



メトリ法よりも短時間で測定が可能であるため、SWV 法を使用した。 $\text{Cd}^{2+}$  及び  $\text{Pb}^{2+}$  分析は、初めは -1.3 V で 240 秒間印加し、 $\text{Cd}^{2+}$  及び  $\text{Pb}^{2+}$  を電極表面に還元濃縮する。その後、-1.3 V から 0.6 V に電位とスイープし、酸化電位と酸化電流ピークから定量・定性分析を行った。

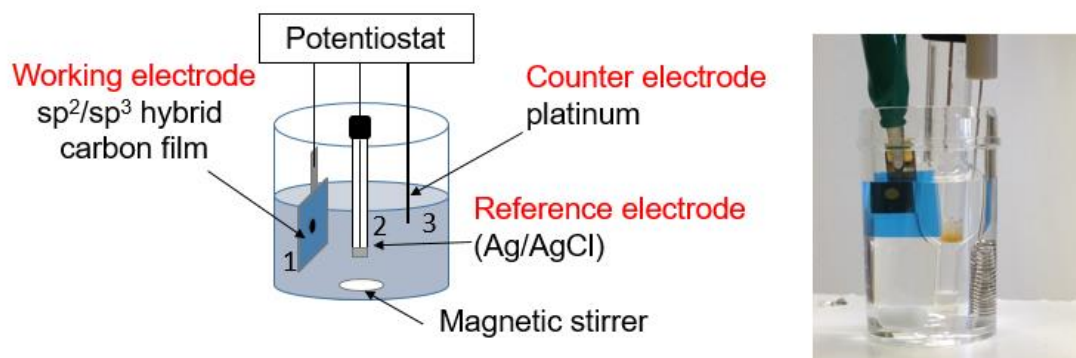


図 2-10-1 ASV 測定のための電気化学的測定セル

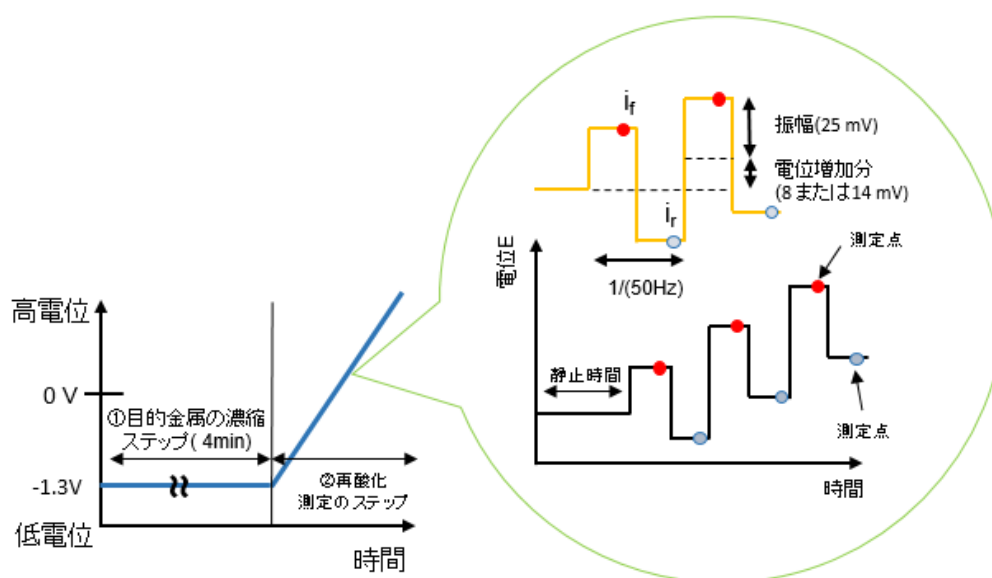


図 2-10-2 ASV 測定の条件



## 2-7 結果考察

### 2-7-1 UBM ナノカーボン薄膜の物理的性質と電気化学的性質

まず、GCとUBMナノカーボン薄膜におけるCVの測定を行った。CV測定は、電気学特性を調べるための方法の1つとして広く用いられている。図2-11 (a)のように電位を印加した、電極と活性種の電子移動速度が十分に速く1電子酸化還元反応でかつ、拡散律速である場合、酸化ピークと還元ピークの差 ( $\Delta E_p$ ) は60 mV (図2-11 (b)、黒線)となり、電子移動速度( $k^0$ )が遅い反応では、図2-11 (b)の赤線に示すように $\Delta E_p$  は大きくなる。そのため、CV測定における $\Delta E_p$ を測定すれば、活性種に対する電極の電子移動速度などの情報を得る事ができる。電極表面の官能基や形状に電子移動速度が影響しない、ヘキサアンミンルテニウム( $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ )、表面のグラファイト構造のエッジ面に鋭敏なフェリシアン化カリウム( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ )のCV測定をすることで電極の電気化学特性の検討を行った。

$\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ と $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ の $k^0$ と $\Delta E_p$ を図2-12と表2-2に示す。表面の状態に影響しない $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ の $k^0$ と $\Delta E_p$ は、ほぼGC電極と同じ値を示し、本論文で用いたカーボン電極において、ASV測定に影響を与えるような電気抵抗の上昇は確認されず、ASVの測定に十分な電気伝導性を有する事が分かった。Bartlettらは、グラファイト構造のベール面よりエッジ面の方が、金属の還元に寄与することを明らかにしている<sup>[31]</sup>。またSwain等は、電極のO/Cと電極面積がほぼ一緒の場合、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ の $k^0$ はエッジ面に依存する事を報告している。表2-3はUBM(80: 20)、UBM (64: 36)、UBM (50: 50)及びGC電極における、電極表面上のO/C比を示す。UBMナノカーボン薄膜のO/C比はほぼ一緒の値を示し、電極面積は一定であるため、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ の $k^0$ 値はエッジ面の量に依存すると考えた。それゆえ、電極中のエッジ面の量を $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ の $k^0$ から見積もった。図2-12と表2-2に示めされる $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ の $k^0$ と $\Delta E_p$ は、電極中の $\text{sp}^3$ 結合が増加するに従い減少する事が確認された。またUBM(50:50)の $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ の $k^0$ は、UBM(80:20)の $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ の $k^0$ に対して、4.5倍低い値を示し電極中のエッジ面が少ない事が分かった。

以上の結果から、電極の  $\text{sp}^2$  結合が減少するに従いエッジ面が減少したと考えられる。また、過剰な  $\text{sp}^3$  成分の増加によって電気抵抗が高くなる事は確認しており、 $\text{sp}^3$  含有率が 56%を超えると iR ドロップ等の影響が認められ、抵抗が大きくなり電極として使用できなかった。それゆえ、 $\text{sp}^3$  結合が 20%～50%の UBM ナノカーボン薄膜を使用して ASV 測定を行った。また、UBM スパッタ装置では、 $\text{sp}^3$  結合が 0%のカーボン薄膜を製膜する事が不可能であるため、GC 電極を 0%  $\text{sp}^3$  結合の電極として使用した。

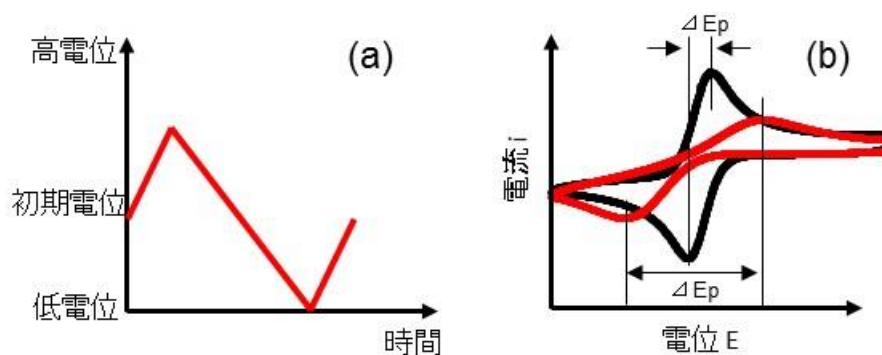


図 2-11 CV 測定のパルス電位の例(a)と CV 応答の例(b)

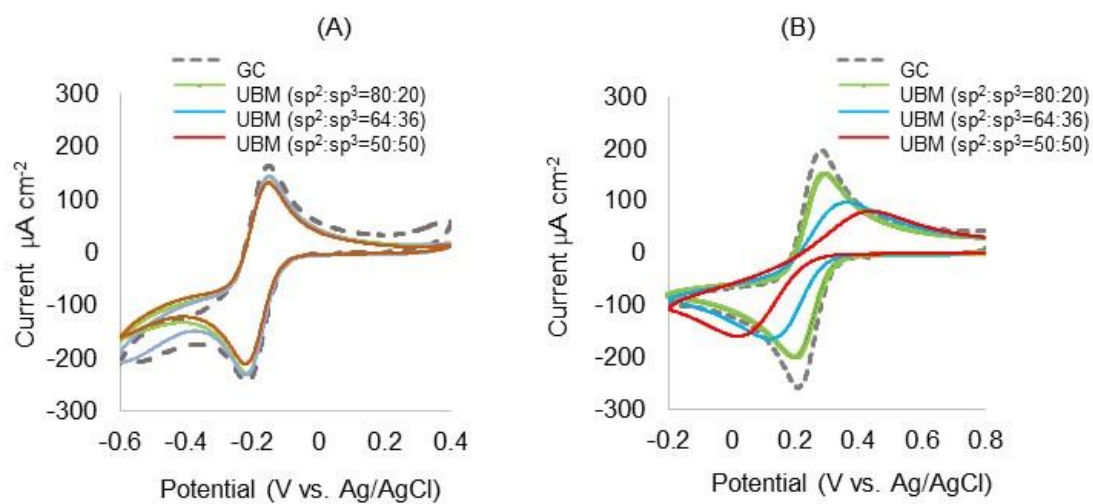


図 2-12 サイクリックボルタモグラム

(A) 1.0 mM  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$  (1.0 M KCl) (B) 1.0 mM  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  (1.0 M KCl) (スキャン速度は 100 mV/s)

表 2-2  $sp^2$ :  $sp^3$  比が異なったカーボン電極における  
 $Ru(NH)_3^{3+/2+}$  と  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  の電子移動速度

Carbon electrode	$k^0, Ru(NH)_3^{3+/2+}$ ( $cm\ s^{-1}$ )	$\Delta Ep$ (mV) $Ru(NH)_3^{3+/2+}$	$k^0, Fe(CN)_6^{3-/4-}$ ( $cm\ s^{-1}$ )	$\Delta Ep$ (mV) $Fe(CN)_6^{3-/4-}$
GC	0.00249	66	0.00254	73
UBM (80:20)	0.00209	70	0.00200	93
UBM (64:36)	0.00207	68	0.00083	240
UBM (50:50)	0.00207	75	0.00043	417

括弧内は  $sp^2$ :  $sp^3$  を示す

表 2-3 様々な UBM ナノカーボン薄膜と GC の  $sp^3/(sp^2+sp^3)$ 、O/C 比

Carbon electrode <sup>a</sup>	$sp^3/(sp^2+sp^3)$	O/C ratio <sup>b</sup>
GC	0	0.09
UBM-20	0.20	0.03
UBM-75	0.36	0.03
UBM-100	0.50	0.02

UBM の後の数字は作製時のイオンの加速電圧を示す

O/C 比は XPS から求めた数字を示す

## 2-7-2 測定溶液の pH とキレート材の最適化

一般的に金属イオンは、強酸性で溶解し、中性からアルカリ性で沈殿する金属と、中性付近で沈殿した後、アルカリ性で再溶解する金属に分類できる。図 2-13 に示すように、錯形成剤を入れておくことによって、弱酸でも沈殿する事無く、錯イオンとして溶解させる事が可能である。カドミウムや鉛などを安定に溶解させる為に酢酸、クエン酸などのカルボン酸溶液が主に用いられている。電極で金属を還元する場合、測定溶液の pH が安定である事も要求されるため、それぞれの錯化材の緩衝領域 ( $pK_a \pm 1$ ) の範囲の pH で実験を行った。

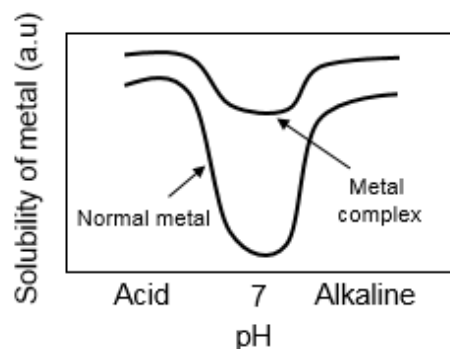


図 2-13 pH と金属の溶解度の関係

まずは、Cd と Pb の測定溶液の最適化を、錯形成安定度定数と水素過電圧から検討した。図 2-14 (A)は、0.1 M の EDTA(pH 5.0)、クエン酸緩衝液(pH 2.0 と 5.0)、酢酸緩衝液(pH 5.0)を用いて、ASV を行った時の  $Cd^{2+}$  の繰り返し測定の結果を示す。EDTA(pH 5.0)を用いた場合、ASV の電流値を得ることができなかった。クエン酸緩衝液(pH 5.0)を用いた場合、最初は検出できなかったが、徐々に電流値を検出することができた。これらの結果から、 $Cd^{2+}$  の濃度を正確に見積もることは困難であった。一方、酢酸緩衝液(pH 5.0)では他の測定溶液よりも安定して大きな電流値を測定できた。酢酸、クエン酸、EDTA と  $Cd^{2+}$  との錯形成安定度定数(Complex formation constant:  $K$ )の値を調べた。 $Cd^{2+}$  との酢酸錯体の  $K$  値は 2.3 であり、クエン酸錯体( $K=11.3$ )と EDTA 錯体( $K=16.4$ )に比べて安定性が弱いことを示している。これらの結果から、金属錯体が安定だと電極と金属錯体間での電子授受反応が起こりにくいことを示している。それゆえ、比較的弱い金属錯体が  $Cd^{2+}$  の測定溶液に適していることが分かった。

図 2-14 (B)は、 $Pb^{2+}$  イオンの繰り返し測定の結果を示す。 $Pb^{2+}$  の場合も、EDTA(pH 5.0)とクエン酸緩衝液(pH 5.0)溶液では、酸化電流を検出できなかった。また酢酸緩衝液(pH 5.0)においてはわずかにしか酸化電流を検出できなかった。酢酸、クエン酸、EDTA と  $Pb^{2+}$  との  $K$  値は、それぞれ、 $K=4.0$ 、5.0、18.3 である。これらの  $Pb^{2+}$  錯体の  $K$  値は  $Cd^{2+}$  酢酸錯体よりも大きいため、電極と錯体間の電子授受反応が比較的起こりにくいと考えた。そこで錯体の安定性を下げるために、測定溶液の pH を 2.0 まで下げた(クエン酸緩衝液)。図 2-14(B)に示すとおり、酢酸緩衝液(pH 5.0)の場合と比較して、クエン酸(pH 2.0)緩衝液を使用すると約 30 倍高い電流値を検出できた。しかしながら、クエン酸緩衝液(pH 2.0)では  $Cd^{2+}$  の電流値がほとんど得られなかった。図 2-15 に示すように  $Cd^{2+}$  と  $Pb^{2+}$  の酸化電位は、それぞれ -0.74 V、-0.52 V(vs. Ag/AgCl)であり、それぞれの溶液での水素過電圧と金属の還元電位を考慮して還元効率との関係を考察した結果を図 2-16 に示す。図 2-16 に示すように  $Cd^{2+}$  では、還元電位が卑な金属であるため、水素イオンの多いクエン酸緩衝液(pH 2.0)を使用すると、水素イオンの還元が優先的に起こる。一方、 $Pb^{2+}$  の還元電位は  $Cd^{2+}$  よりも貴であるため、水素イオンの還元の影響を比較的受けにくい。そのため  $Pb^{2+}$  は、pH の低い溶液でも測定が可能であると推定した。錯形成安定度定数と測定溶液中の水素過電圧を考慮して、 $Cd^{2+}$  と  $Pb^{2+}$  の測定溶液は、それぞれ酢酸緩衝液(pH 5.0)とクエン酸緩衝液(pH 2.0)に決定した。

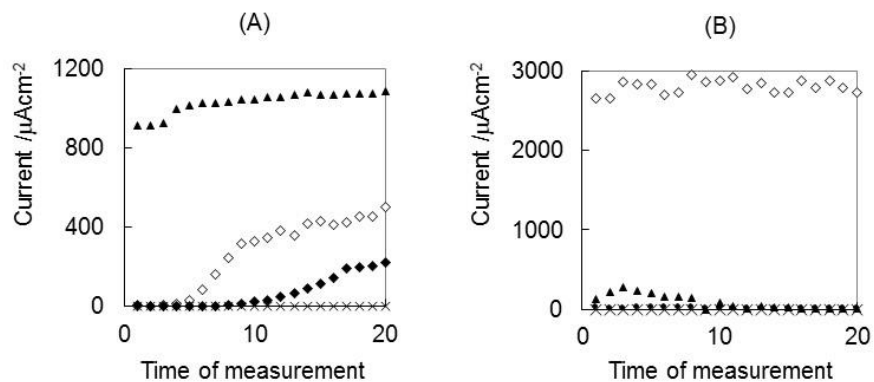


図 2-14 様々な測定溶液における 1000 ppb の電流値と繰り返し性、Cd<sup>2+</sup>、(B) Pb<sup>2+</sup>、×EDTA (pH 5.0)、◆クエン酸緩衝溶液(pH 5.0)、◇クエン酸緩衝溶液(pH 2.0)、▲ 酢酸緩衝溶液(pH 5.0)

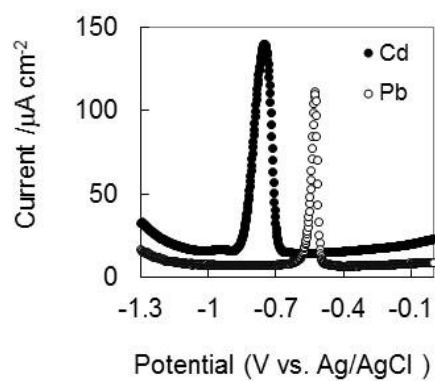


図 2-15 100 ppb Cd<sup>2+</sup>(酢酸緩衝溶液 pH 5.0)と 100 ppb Pb<sup>2+</sup>(クエン酸緩衝溶液 pH 2.0) のボルタモグラム

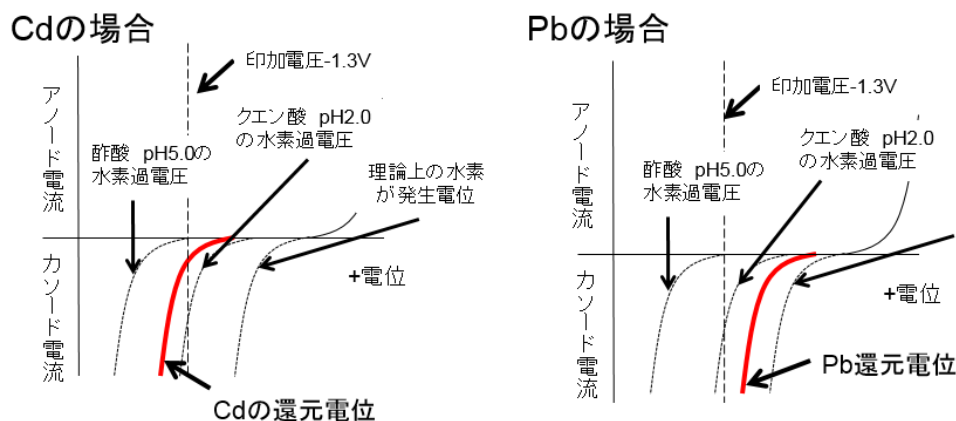


図 2-16 電位窓と還元効率の関係

### 2-7-3 還元電位とスキャン速度及び時間依存性の最適化

UBM (50:50)電極を用いて、図 2-10-2 における ASV の 3 点について測定条件の最適化を行った。還元電位、スキャン速度、堆積時間の最適化を行った。図 2-17-1 (A)と(B) に、1000 ppb の  $\text{Cd}^{2+}$  酢酸(pH 5.0) (A)と  $\text{Pb}^{2+}$ クエン酸 (pH 2.0) (B) 条件下における、堆積電位と ASV 測定における酸化電流値の関係を示す。 $\text{Cd}^{2+}$ も  $\text{Pb}^{2+}$ も -1.0 V (vs. Ag/AgCl)よりも低い電位から酸化電流値が大きくなり、-1.3 V で最大値を示した。堆積電位を-1.3 V 以上印加すると電極表面に気泡が覆い電流値が徐々に減少した。それゆえ、 $\text{Cd}^{2+}$ と  $\text{Pb}^{2+}$ 堆積電位を-1.3 V にした。次に ASV 測定における SWV 測定におけるスキャン速度(電位増加分 (mV)×周波数( $\text{s}^{-1}$ ))の最適化を行った。(図 2-10-2 参照) 振幅 0.025 V, 周波数 50 Hz は一定にし、電位増加分を変化させた。

図2-17-2 (A)と(B)にASVにおける $\text{Cd}^{2+}$ と $\text{Pb}^{2+}$ イオンのスキャン速度に対するシグナル(酸化電流)とノイズ電流の関係を示す。スキャン速度を80 mV/sから900 mV/sの範囲で変えて測定を行った。スキャン速度に応じて、それぞれの金属の酸化電流値は増加し $\text{Cd}^{2+}$ 及び $\text{Pb}^{2+}$ においてそれぞれ、400mV  $\text{s}^{-1}$ または700 mV  $\text{s}^{-1}$ 付近で、シグナル/ノイズ比 (signal to noise: S/N) の最大値を得た。それ以上の速度になると、ノイズ電流の増加とピークの形状の歪みが生じた。それゆえ、 $\text{Cd}^{2+}$ 及び $\text{Pb}^{2+}$ の測定条件は、それぞれ400m, 800 mV/sに決定した。次に、堆積時間の図2-17-3 (A)と(B)に UBM (50:50)を用いた-1.3 Vの堆積時間に対する酸化電流値の関係を示す。50 ppb  $\text{Cd}^{2+}$ 及び $\text{Pb}^{2+}$ の酸化電流は堆積時間に応じて30秒から～10分までの範囲で電流値は増加した。それ以上堆積時間を流しても電流値が飽和するか、減少する結果が得られた。迅速性を考慮して堆積時間を4 minに決定した。また同様の実験をGC電極でも行ったが、最適な測定条件はほとんど同じであった。上記の結果からカドミウムと鉛の最適な測定条件は、それぞれ、Cd: -1.3V (vs. Ag/AgCl)、240 s、振幅0.025 V、周波数50 Hz、電位増加分8 mV、0.1M 酢酸緩衝溶液(pH 5.0)、Pb: -1.3 V (vs. Ag/AgCl)、240 s、振幅0.025 V、周波数50 Hz、電位増加分14 mV、0.1 M クエン酸緩衝溶液(pH 2.0)で測定を行う事を決定した。

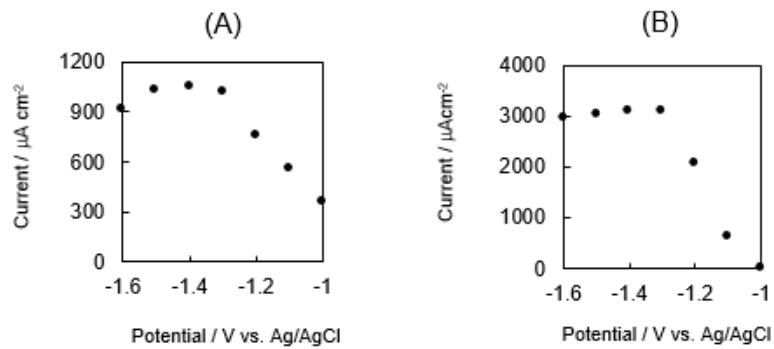


図 2-17-1 堆積電位と ASV の酸化電流の関係  
(A) 1000 ppb  $\text{Cd}^{2+}$  (酢酸 pH 5.0)、(B) 1000 ppb  $\text{Pb}^{2+}$  (クエン酸 pH 2.0)

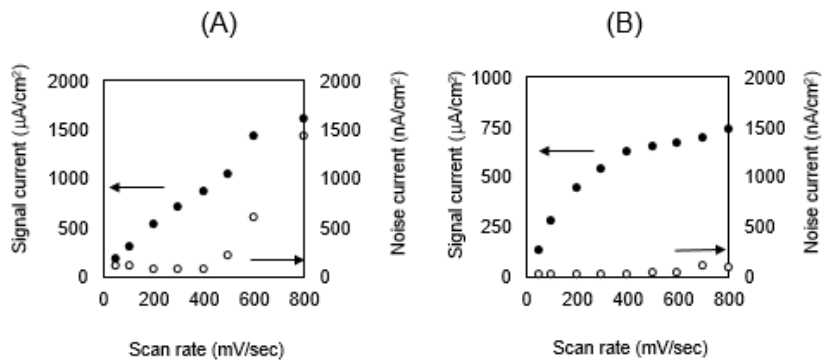


図 2-17-2 UBM (50:50)を用いたスキャン速度に対するシグナルとノイズ電流の関係  
(A) 100 ppb  $\text{Cd}$  (酢酸 pH 5.0)、(B) 100 ppb  $\text{Pb}$  (クエン酸 pH 2.0)、●:シグナル電流、○:ノイズ電流

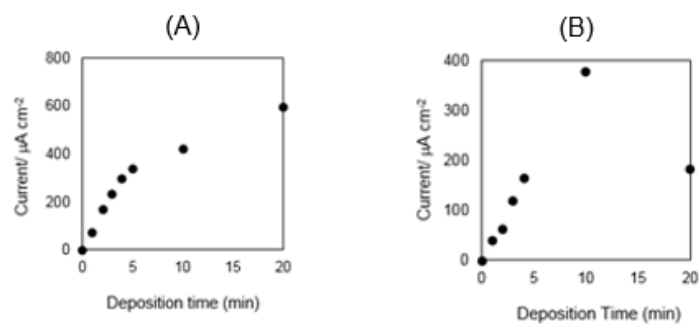


図 2-17-3 UBM (50:50)を用いた堆積時間に対する酸化電流値の関係

#### 2-7-4 $\text{Cd}^{2+}$ と $\text{Pb}^{2+}$ の検量線

測定条件の最適化の後に、本題である  $\text{sp}^2/\text{sp}^3$  が複合したカーボン薄膜における、 $\text{sp}^2/\text{sp}^3$  比の ASV に及ぼす影響を検討した。電極中の  $\text{sp}^2/\text{sp}^3$  比がどのように ASV に影響を与えるか調べるために、UBM (50:50), UBM (64:36), UBM (80:20) の UBM カーボン電極と GC 電極を用いた。 $\text{Cd}^{2+}$  と  $\text{Pb}^{2+}$  の検量線を図 2-18 (1) と (2) に示す。また図 2-18 (1) と (2) から算出した検出下限と、繰り返し測定の結果を表 2-4 に示す。すべてのカーボン電極において 0~50 ppb の範囲で重金属の濃度と電流値に直線関係が得られた。電極中の  $\text{sp}^3$  結合が増加するに従い、 $\text{Cd}^{2+}$  と  $\text{Pb}^{2+}$  の検量線の傾き(感度)は減少した。UBM (80:20) と比較すると、UBM (50:50) を用いた  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  の検量線の感度は、それぞれ 73%、75% も減少した。この結果は、2-7-1 でも示した通り、 $\text{sp}^3$  結合が増加することによってグラファイト構造に由来するエッジ面が減少したため、感度が減少したと考えられる。しかしながら、 $\text{sp}^3$  結合が増加すると感度は減少するが、UBM (50:50) は他のカーボン電極よりも低い検出下限を示した( $\text{Cd}^{2+}$ : 0.25 ppb,  $\text{Pb}^{2+}$ : 1.0 ppb) (表 2-4)。感度が減少するのに、検出下限が向上する原因を突き止めるために、それぞれの電極におけるシグナルとノイズの比較を行った。図 2-18 (3) と (4) に  $\text{sp}^3/(\text{sp}^2+\text{sp}^3)$  に対する各金属濃度が 50 ppb のシグナル電流値とノイズ電流の関係を示す。また表 2-5 にそれぞれの電極の感度、ノイズ電流、S/N 比を示す。電極中の  $\text{sp}^3$  結合が増えるに従い、シグナル電流もノイズ電流も減少することが分かった。UBM (80:20) と比較すると UBM (50:50) を用いた  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  のシグナル電流は、それぞれ 4 および 6 倍も減少した。UBM (80:20) と比較すると UBM (50:50) を用いた  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  のノイズ電流は、それぞれ 8 および 7 倍も減少した。これらの点から  $\text{sp}^3$  結合の増加に依存して、同じ割合ではシグナル電流とノイズ電流は減少しないことが分かった。つまりシグナルの減少に比べてノイズ電流がより減少する事で、S/N 比が向上することが分かった。また、表 2-4 に示すように繰り返し性を比較すると、 $\text{sp}^3$  結合が増えるに従いばらつきが減少する結果が得られた。 $\text{sp}^2$  結合を多く含むカーボン電極では、電気化学分析中に電極表面が酸化するため(カルボニル基等の導入)、その安定性に課題が残ると言われている。また、BDD のような  $\text{sp}^3$  結合カーボン電極では化学的な安定性がよく報告されており、表面が酸化されにくく電気化学分析に用いた際に繰り返し安定性に優れていることが知られている<sup>[29a]</sup>。UBM ナノカーボン電極においても、 $\text{sp}^3$  結合が増えるに従い、同じような効果でばらつきが減少したと考えられるが、その原因は調査中である。検出下限と測定の繰り返し性を総合的に評価すると、UBM (50:50) 電極が最も  $\text{Cd}^{2+}$  と  $\text{Pb}^{2+}$  の測定に適していることが分かった。また、従来から使用されている GC 電極と比較しても、検出下限を約 1 桁向上し、繰り返し性も向上している。また表 2-4 で示すように、従来法である AAS 法や ICP-MS と比較すると、ICP-MS の性能には及ばないが、AAS とほぼ同等の検出下限と繰り返し性を達成できた。



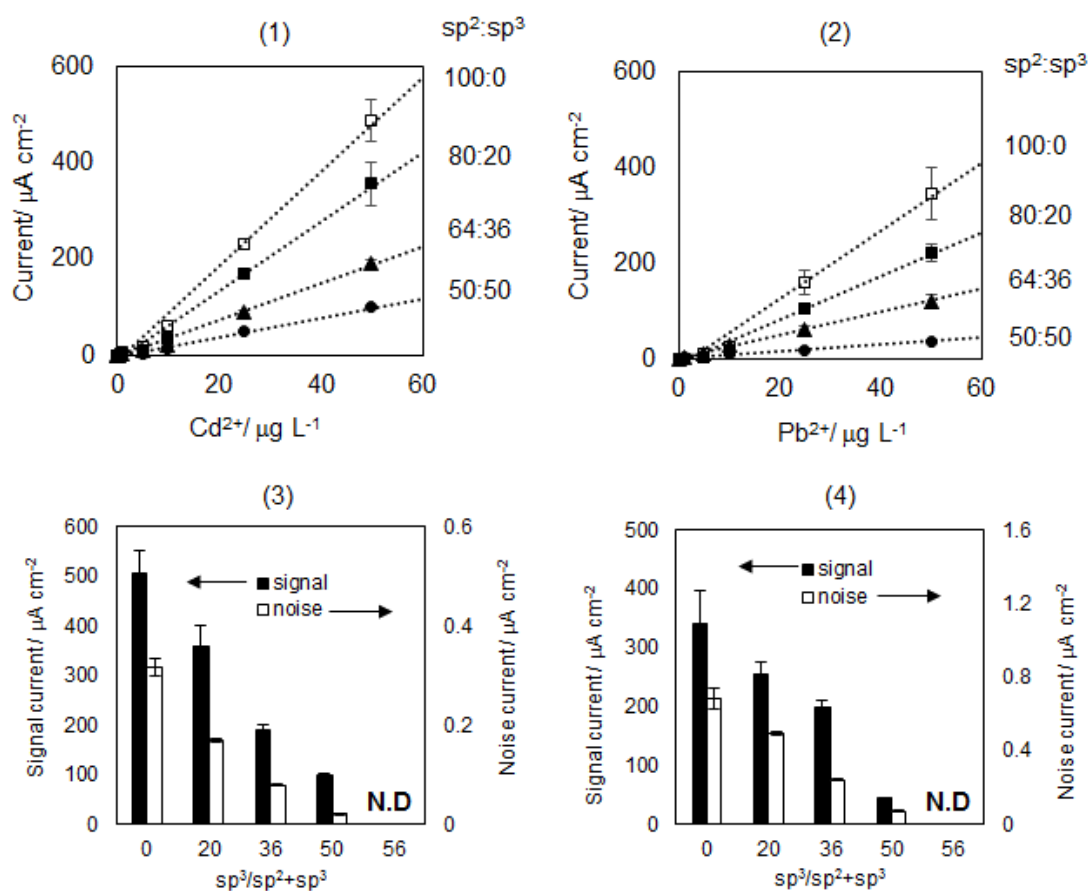


図 2-17 検量線 (1)  $\text{Cd}^{2+}$  in acetate (pH 5.0) and (2)  $\text{Pb}^{2+}$  in citrate (pH 2.0) ●UBM (50:50), ▲ UBM(64:36), ■ UBM (80:20) and □; GC 電極 (100:0). エラーバーは、繰り返し測定 of 三回の標準偏差を示す。(3) と (4) 50 ppb  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$ におけるそれぞれの電極のシグナル電流及びノイズ電流を示す。

表 2-4 様々な UBM ナノカーボン薄膜と GC 電極の ASV 結果と従来法である AAS と ICP-MS における検出下限と繰り返し性の比較

		ASV method ( $\text{sp}^2:\text{sp}^3$ ) <sup>a</sup>				AAS	ICP-MS
		GC (100:0)	UBM (80:20)	UBM (64:36)	UBM (50:50)		
$\text{Cd}^{2+}$	検出下限 /ppb	1.0	0.50	0.50	0.25	0.1	0.003
	繰り返し性 / % <sup>b</sup>	31.0	25.6	8.9	4.6	< 5 %	3.2 %
$\text{Pb}^{2+}$	検出下限 /ppb	5.0	5.0	1.0	1.0	0.5	0.005
	繰り返し性 / % <sup>b</sup>	33.1	20.6	14.7	6.4	< 12 %	2.6 %

括弧内は  $\text{sp}^2:\text{sp}^3$  を示す。 1.0 ppb における繰り返し測定 (N=3)

表 2-5 様々な UBM ナノカーボン薄膜と GC 電極を用いた、 $\text{Cd}^{2+}$  及び  $\text{Pb}^{2+}$  の ASV 測定における感度、BG 電流、ノイズ電流、50 ppb における S/N

Carbon electrode	$\text{Cd}^{2+}$				$\text{Pb}^{2+}$			
	GC (100:0)	UBM (80:20)	UBM (64:36)	UBM (50:50)	GC (100:0)	UBM (80:20)	UBM (64:36)	UBM (50:50)
感度 ( $\mu\text{A cm}^{-2} (\text{ppb})^{-1}$ )	10.5	7.4	3.8	2.0	7.1	4.6	2.0	0.71
ノイズ電流 ( $\text{nA cm}^{-2}$ )	317	170	80	22	710	512	151	73
BG 電流 ( $\mu\text{A cm}^{-2}$ )	26.4	21.4	9.1	7.2	7.3	6.7	6.9	5.9
S/N 比 ( $\times 10^3$ at 50 ppb)	1.6	2.1	2.4	4.6	0.48	0.43	0.78	0.50

## 2-8 結論

本章では、UBM ナノカーボン薄膜電極を用いたカドミウムと鉛の分析において、測定条件とカーボン膜の組成の最適化を行った。これらの測定条件を、錯体の安定性と水素過電圧を考慮して決定し、Cd には酢酸緩衝溶液(pH5.0)、Pb にはクエン酸緩衝溶液(pH2.0)が最適な溶液である事が明らかになった。また、カーボン中の  $\text{sp}^3$  結合が増加するとシグナルとノイズレベルが低下するが、シグナルが減少するよりもノイズ電流の減少率の方が大きいため S/N 比が向上する事も分かった。その結果、 $\text{sp}^3$  結合が 50%複合した UBM ナノカーボン薄膜がカドミウムと鉛の検出に最適であり、その検出下限はそれぞれ、0.25 ppb 及び 1.0 ppb であった。従来方法と比較すると AAS とほぼ同等の検出下限と安定性を達成できた。また、WHO の飲料水の基準値(Cd: 3 ppb、Pb: 10 ppb)も担保できる検出下限を達成できた。

また  $\text{sp}^3$  結合を多く含んだ炭素電極は、表面が酸化されにくく電気化学分析に用いた際に繰り返し安定性に優れているためであり、この高い繰り返し性は  $\text{sp}^2$  結合を含む GC 電極では得られなかった。

以上の結果から、カーボン中に存在する  $\text{sp}^2$  と  $\text{sp}^3$  結合比の影響が、重金属分析における感度、シグナル、ノイズ、繰り返し性にどのように影響するかが明らかになり、 $\text{sp}^2$  結合と  $\text{sp}^3$  結合が複合したカーボン薄膜における、低濃度検出が達成できた。

## 参考文献

- [1] M. S. Nahar, J. Zhang, *Environ. Geochem. Health* **2012**, *34*, 141-150.
- [2] aH. Y. Cheng, L. Falat, R. L. Li, *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 1384-1388; bI. Švancara, K. Vytřas, J. Barek, J. Zima, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2001**, *31*, 311-345.
- [3] K. R. Kneten, R. L. McCreery, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2518-2524.
- [4] aR. J. Bowling, R. T. Packard, R. L. McCreery, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1217-1223; bG. M. Swain, *J. Electrochem. Soc.* **1994**, *141*, 3382-3393.
- [5] R. L. McCreery, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2646-2687.
- [6] A. Dekanski, J. Stevanović, R. Stevanović, B. Ž. Nikolić, V. M. Jovanović, *Carbon* **2001**, *39*, 1195-1205.
- [7] W. E. Van der Linden, J. W. Dieker, *Anal. Chim. Acta* **1980**, *119*, 1-24.
- [8] G. M. Jenkins, K. Kawamura, *Polymeric carbons--carbon fibre, glass and char*, Cambridge University Press, **1976**.
- [9] G. M. Swain, R. Ramesham, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 345-351.
- [10] M. C. Granger, M. Witek, J. Xu, J. Wang, M. Hupert, A. Hanks, M. D. Koppang, J. E. Butler, G. Lucazeau, M. Mermoux, J. W. Strojek, G. M. Swain, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3793-3804.
- [11] M. D. Koppang, M. Witek, J. Blau, G. M. Swain, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1188-1195.
- [12] T. N. Rao, I. Yagi, T. Miwa, D. A. Tryk, A. Fujishima, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2506-2511.
- [13] C. Prado, G.-U. Flechsig, P. Grundler, J. S. Foord, F. Marken, R. G. Compton, *Analyst* **2002**, *127*, 329-332.
- [14] aK. B. Holt, C. Forryan, R. G. Compton, J. S. Foord, F. Marken, *New J. Chem.* **2003**, *27*, 698-703; bT. A. Ivandini, K. Honda, T. N. Rao, A. Fujishima, Y. Einaga, *Talanta* **2007**, *71*, 648-655; cY. Show, M. A. Witek, P. Sonthalia, G. M. Swain, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 879-888.
- [15] J. Robertson, *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2002**, *37*, 129-281.
- [16] N. Sekioka, D. Kato, A. Ueda, T. Kamata, R. Kurita, S. Umemura, S. Hirono, O. Niwa, *Carbon* **2008**, *46*, 1918-1926.
- [17] A. Ueda, D. Kato, R. Kurita, T. Kamata, H. Inokuchi, S. Umemura, S. Hirono, O. Niwa, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4840-4846.
- [18] O. Niwa, J. Jia, Y. Sato, D. Kato, R. Kurita, K. Maruyama, K. Suzuki, S. Hirono, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7144-7145.
- [19] D. Kato, N. Sekioka, A. Ueda, R. Kurita, S. Hirono, K. Suzuki, O. Niwa, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3716-3717.
- [20] R. Kurita, K. Nakamoto, Y. Sato, T. Kamata, A. Ueda, D. Kato, S. Hirono, O. Niwa, *Anal. Sci.* **2012**, *28*, 13-20.
- [21] T. Kamata, D. Kato, H. Ida, O. Niwa, *Diamond Relat. Mater.* **2014**, *49*, 25-32.
- [22] L. Moreno-Baron, A. Merkoçi, S. Alegret, *Electrochim. Acta* **2003**, *48*, 2599-2605.
- [23] D. Sun, X. Xie, Y. Cai, H. Zhang, K. Wu, *Anal. Chim. Acta* **2007**, *581*, 27-31.
- [24] Z. Nie, C. A. Nijhuis, J. Gong, X. Chen, A. Kumachev, A. W. Martinez, M. Narovlyansky, G. M. Whitesides, *Lab on a chip* **2010**, *10*, 477-483.
- [25] H. Yanagisawa, R. Kurita, T. Kamata, D. Kato, O. Niwa, *Electrochemistry* **2014**, *82*, 949-953.
- [26] B. Khadro, A. Sikora, A. S. Loir, A. Errachid, F. Garrelie, C. Donnet, N. Jaffrezic-Renault, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, *155*, 120-125.
- [27] A. Zeng, E. Liu, S. N. Tan, S. Zhang, J. Gao, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1294-1298.
- [28] aA. Sbartaï, P. Namour, A. Errachid, J. Krejčí, R. Šejnohová, L. Renaud, M. Larbi Hamlaoui, A.-S. Loir, F.

- Garrelie, C. Donnet, H. Soder, E. Audouard, J. Granier, N. Jaffrezic-Renault, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 4805-4811; bJ. Wang, B. Tian, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1529-1532.
- [29] aE. A. McGaw, G. M. Swain, *Anal. Chim. Acta* **2006**, 575, 180-189; bR. Feeney, S. P. Kounaves, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2222-2228.
- [30] J. Buffle, M. L. Tercier-Waeber, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2005**, 24, 172-191.
- [31] P. N. Bartlett, G. Denuault, M. F. B. Sousa, *Analyst* **2000**, 125, 1135-1138.

## 第3章 実試料分析における妨害物質の影響および前処理法の検討

### 3-1 緒言

国土交通省によると、平成22年における日本の水使用(取水量ベース)は、約809億 $\text{m}^3$ /年、生活用水約152億 $\text{m}^3$ 、工業用水約113億 $\text{m}^3$ 、農業用水約544億 $\text{m}^3$ (100億 $\text{m}^3$ =東京ドーム約8100杯分)という膨大な量になる。人が使った水は排水されて自然界に戻り、循環することで水が再生されている。水資源を無駄なく使用することは言うまでもなく、一度使用した水資源を安全な状態にして再利用する必要がある。そこで、高度な水処理技術が求められ、同時に汚染状態をモニタリングすることは重要である。水質に関する規制は環境基準や水質汚濁防止法などにより定められており、重金属が測定項目の一つとして規制されている。重金属の分析には、現場からサンプルを持ち帰り、AASやICP発光分析といった大型装置で測定するのが現状である。そのため安価で小型の方法が開発されれば、その場で分析が可能になり、水質などの検査モニタリングに使用でき、水の安全確保および有効利用ともに、安心して安全な水の確保が期待できる。1章で述べたように、電気化学的手法は、重金属の濃度を高感度、簡易性に検出できる優れた方法である。2章で、 $\text{Cd}^{2+}$ と $\text{Pb}^{2+}$ のASV測定条件、 $\text{sp}^2$ 結合と $\text{sp}^3$ 結合が複合したカーボン電極の $\text{sp}^2/\text{sp}^3$ 比の最適化し高感度化で安定に測定することに成功した。しかしながら、工場排水中の重金属をASV測定でモニタリングするためには、妨害物質を除去することが要求される。本章では、2章で最適化したカーボン電極材料を用いて、工場排水中に想定される妨害物質の前処理方法について検討し、カドミウムと鉛の実試料分析を目指した。

### 3-2 着想に至った経緯

妨害物質の選定の前に、工場排水の汚染物質とその物理的・化学的な処理技術について整理しまとめた。工場排水の中には、さまざまな汚染物質が存在し、これらが適切な処理に基づいて放流しないと環境破壊や病気などを引き起こす原因になる。近年、環境に対する意識も高まりつつあり、有害物質の法的規制が行われ、その処理技術が開発されている。現在の処理技術から考慮して、工場排水中に想定される妨害物質を選定し、より簡便なシステムに適した前処理法を開発し、 $\text{Cd}^{2+}$ と $\text{Pb}^{2+}$ を測定できる方法を考案することを目的とした。

### 3-3 工場排水に含まれる妨害物質

汚染物質の浄化方法には、以下の三種がある

- ① 物理的作用：汚染物質を沈殿させ、水中に存在する濃度を低下させる方法
- ② 化学的作用：酸化・還元などの作用によって無害の物質に変化させるか、沈殿させ水中に存在する濃度を低下させる方法
- ③ 生物的作用：有機物を微生物によって分解させる方法

工場排水に混入している物質には、大きくわけて無機物と有機物がある。まずは、有機物の除去について述べ、そのあと無機物(特に重金属の処理法)について述べた。

### 3-4 有機物の処理方法と想定される有機物の濃度

有機物を分解する方法として、促進酸化法と生物学的処理ある。促進酸化法は、酸化力の強い OH ラジカルで、有機物を分解する方法である。図 3-1 に示すように有機物は低分子の有機酸を経て、最終的に二酸化炭素と水に分解するが、生成してもすぐに消滅してしまう欠点がある。したがって実際の処理では、絶え間なく OH ラジカルを供給する必要がある。その点、生物学的処理とは、図 3-2 に示すように、工場排水の有機物を微生物に処理させる方法がある。微生物による分解方法は、効率よく短時間に処理でき一般的に使用されている。公共用水域の水質汚濁に係る環境基準のうち生活環境の保全に関する環境基準が定められている。その有機汚染の指標の一つとして、生物学的酸素要求量 (Biochemical Oxygen Demand: BOD) が用いられる。BOD は、水中の有機物が微生物によって分解されるとき、必要とされる酸素量を換算した量のことである。この BOD の基準値から工場排水に含まれている有機物の濃度を見積もった。BOD の排出基準は 160 mg/L であり、排水中に含まれる有機物の濃度は超えないと仮定し、EDTA とグルコースをモデルに算出した。1 mol の EDTA ( $C_{10}H_{16}N_2O_8$ : 292.25)を微生物で  $CO_2$ 、 $NO_2$ 、 $H_2O$  まで分解するに必要な  $O_2$  は 24 mol である。そのため基準値である BOD 160 mg/L は 0.022 mmol/L の EDTA に相当する。これらの換算濃度から工場排水中に存在する有機物の濃度は 0.1 mM に想定すれば十分であると考えた。

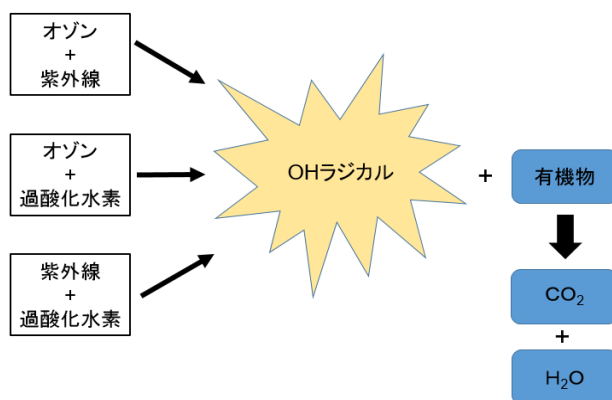


図 3-1 OH ラジカルの生成と有機物の分解

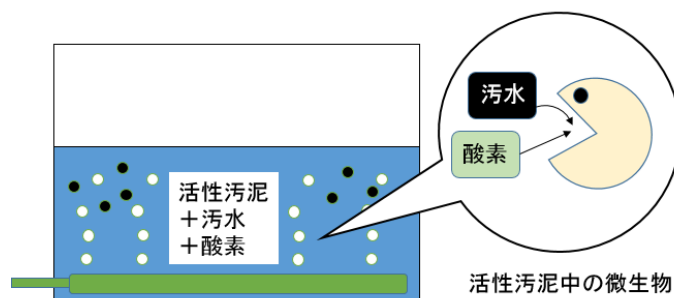


図 3-2 活性汚泥の微生物による分解

### 3-5 ASV 測定における有機物の分解方法

想定される工場排水中の有機物の濃度が定まったので、ASV と組み合わせる分解方法の選定を行った。有機物を含む重金属分析の前処理は、湿式分解法と燃焼法が主に用いられている<sup>[1]</sup>。湿式分解法は、様々な酸化性の試薬を分解に用い、一般に時間を要する。湿式方法は、硝酸、硫酸、あるいは複数の試薬で分解する方法である。この方法は、信頼性があり、AAS や ICP 発光分析(公定法)の前処理として使用されているが、酸化剤は測定者にとって有毒で危険な試薬である。また、完全に分解できているかの見極めが難しく、習熟に時間を要する。燃焼系で行う場合、空気中あるいは酸素気流中などで試料を燃やす方法である。迅速性があるが、加熱分解処理は危険性が高い作業である。また低濃度の場合、コンタミネーションを回避するため、高純度試薬も要求される。そこで一般的には、前者の湿式法が用いられている。

そこで、有毒な酸化試薬を用いない、酸化分解法として真空紫外線を用いた光反応処理法が提案されている<sup>[2]</sup>。図 3-3 (左) のように、水銀ランプから発する 185 nm の紫外線を試料に効率よく照射する光反応装置を用いる方法である<sup>[3]</sup>。この光照射により OH ラジカルを生成させる。OH ラジカルは極めて酸化力が高く、酸化試薬の代わりに用いる事で有機物の分解が可能である。一例として、アルコールがヒドロキシラジカルにより、酸化され二酸化炭素と水に分解する反応を図 3-2 (右) に示す。OH ラジカルは、ほとんどの有機物を分解することが可能であるが、その反応性が高いため溶液中に生成してもすぐに反応し、消滅する欠点がある。しかしながら、排水の有機物の濃度は 0.1mM 程度あるため、紫外線照射装置で充分分解できる濃度である<sup>[5]</sup>。また本方法は、有機物の分解に試薬を使用することなく、溶液を通過させるだけで分解除去が可能であるため、ASV のオンライン測定の前処理に非常に適していると考えた。以上述べてきた背景により、本重金属の ASV 測定における有機物の分解には、紫外線照射装置を用いることにした。

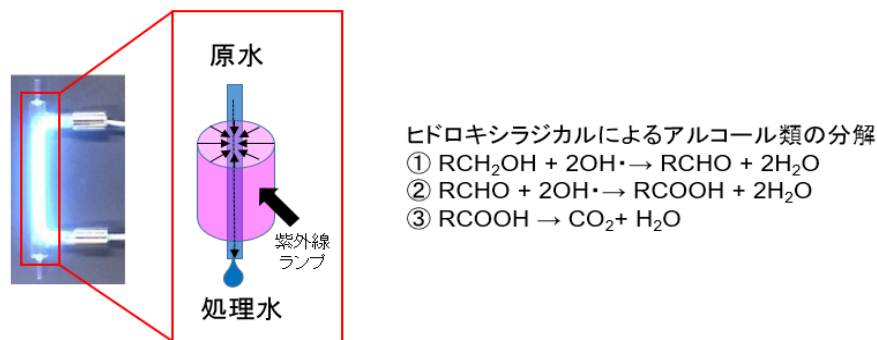


図 3-3 中里らの開発した紫外線照射装置(右) と  
OH ラジカルによるアルコール類の分解(左)

### 3-6 重金属の処理方法と想定される重金属とその濃度

工場排水に含まれている重金属は毒性が強いものが多く蓄積性があるため、極微量であっても繰り返し摂取すると中毒症状を起こす。もっとも知られている公害病として有機水銀による水俣病、カドミウムによるイタイイタイ病が有名である。そのため、工場排水中の重金属は一般的に、アルカリ沈殿法、硫化物法などを用いる沈殿法で処理される。一般的に重金属を含む工場排水は硫化物処理や水酸化物処理が行われる。溶解度積 ( $K_{sp}$ ) は、両イオンのモル濃度の積を用いて表す事ができる。この数字が小さいほど水に溶けにくい事を意味する。表 3-1 に硫化物処理の溶解度積と溶解度を示す。表 3-1 に示すように、硫化物処理を行うと ppt オーダーのレベルまで重金属を取り除くことが可能であり、硫化物を用いた方法では、記載の重金属をほぼ除くことが可能である。しかし、酸性溶液中で使用すると硫化水素を発生する欠点がある。水酸化物の溶解度積と溶解度を表 3-2 に示す。水酸化物処理を行った後の金属の濃度を考慮すると、濃度的に  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ の影響を受けると考えられる。しかしながら、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ は、ターゲット金属( $\text{Cd}^{2+}$ や $\text{Pb}^{2+}$ )よりも標準電極電位が卑な金属であるため、 $\text{Cd}^{2+}$ や $\text{Pb}^{2+}$ の ASV 測定には影響しないと考えた。また、 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ の溶解度は 0.01 ppb 以下になるため、Fe の影響も無視できると考えた。しかしながら、 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ の溶解度積から算出すると、処理後の水中に存在する  $\text{Cu}^{2+}$ の濃度は、11 ppb であり、 $\text{Cd}^{2+}$ や $\text{Pb}^{2+}$ の ASV 測定に影響がでると考えた。以上述べてきた背景により、排水中の ASV 法の重金属の定量において、銅イオンが含まれると想定し、その濃度は、10 ppb 程度であり、過剰に見積もっても 100 ppb を処理できれば良いと考えた。

表 3-1 金属硫化物の溶解度積<sup>[4]</sup>と溶解度

硫化物	$K_{sp}$	溶解度(ppb)
CdS	$8.0 \times 10^{-27}$	0.001>
CuS	$6.3 \times 10^{-36}$	0.001>
FeS	$6.3 \times 10^{-18}$	0.1
PbS	$8.0 \times 10^{-28}$	0.001>
HgS	$1.0 \times 10^{-47}$	0.001>



表 3-2 各 金属水酸化物の溶解度積<sup>[4]</sup>と溶解度

水酸化物	K <sub>sp</sub>	溶解度(ppb)	備考
Al(OH) <sub>3</sub>	1.3×10 <sup>-33</sup>	0.10	電極電位が 卑な金属
Ca(OH) <sub>2</sub>	5.5×10 <sup>-6</sup>	440000	
Mg(OH) <sub>2</sub>	5.6×10 <sup>-12</sup>	2700	
Fe(OH) <sub>3</sub>	2.8×10 <sup>-38</sup>	0.01	溶解度が低い
Cd(OH) <sub>2</sub>	7.2×10 <sup>-15</sup>	1400	測定対象
Pb(OH) <sub>2</sub>	1.4×10 <sup>-20</sup>	32	測定対象
Cu(OH) <sub>2</sub>	2.0×10 <sup>-20</sup>	11	-

### 3-7 ASV における Cu<sup>2+</sup>イオンの除去

想定される工場排水中の妨害金属(Cu<sup>2+</sup>)とその濃度が定まったので、ASV と組み合わせる分解方法の選定を行った。重金属分析において、重金属を濃縮し、マトリックス元素を除去する方法として溶媒抽出<sup>[5]</sup>、共沈法<sup>[6]</sup>などの方法が用いられてきた。溶媒抽出や共沈法は多量の試料を必要とし、コンタミネーションの影響が問題視される。また、カドミウムや鉛の ASV 測定における妨害物質のマスキング剤として、フェロシアン化カリウム<sup>[7]</sup>、シアン化物<sup>[8]</sup>を含む多くの化合物が提案されてきた<sup>[7][8]</sup>。しかしながらこれらの試薬は毒性があり、試薬を添加する必要がある。

近年、栄長等は、図 3-4 のように測定用の電極の他に、カドミウムの妨害となる銅の除去のためにもう一つの電極を配置し除去する測定法を報告している<sup>[9]</sup>。しかしながら、実試料などで使用するにはまだ研究段階である。

上記以外で、水試料中の微量な金属イオンの前処理技術としてキレート樹脂が利用されている。キレート樹脂は金属を選択的に吸着し、濃縮も可能であり、妨害物質を効率的に除去することに有用である。キレート樹脂に対する金属イオンの吸着は、キレート樹脂上の官能基と金属イオン間の相互作用に基づいている。したがって、キレート官能基の種類に依存して、金属イオンに対する選択性、吸着速度、安定性などの特性が異なる。キレート官能基には、イミノ二酢酸型、ジチオカルバミン酸型、アミドキシム型、グルカミン型などがあるが、中でもイミノ二酢酸型が最も一般的に使用されている。様々なイミノ二酢酸型の樹脂が開発されているが、Chelex 100 が最も使用されている。

図 3-5-1 に Chelex 100 樹脂の構造を示す。様々な pH における金属の吸着効率の違いを図 3-5-2 に示すように pH 2.0 条件下では、カドミウムと鉛とはほとんど吸着せず、銅のみを除去できる樹脂である<sup>[10]</sup>。また塩酸などの強酸で処理することで樹脂を再生する事が可能であるため、再生利用が可能である為、長期モニタリングに有用であると考えた。以上の背景を考慮し、Chelex 100 を銅処理の前処理法に用いる事にした。

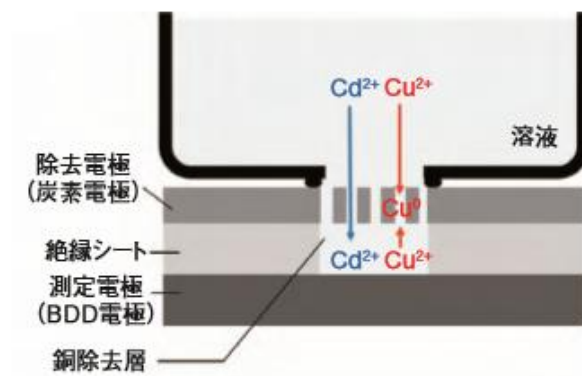


図 3-4 選択的 Cd 検出のためのマルチ電極を用いた電気化学セル<sup>[9]</sup>

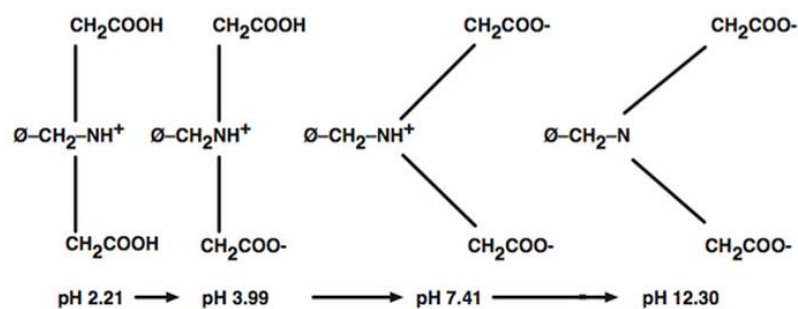


図 3-5-1 Chelex 100 の構造  
(Bio rad Laboratory 社より)

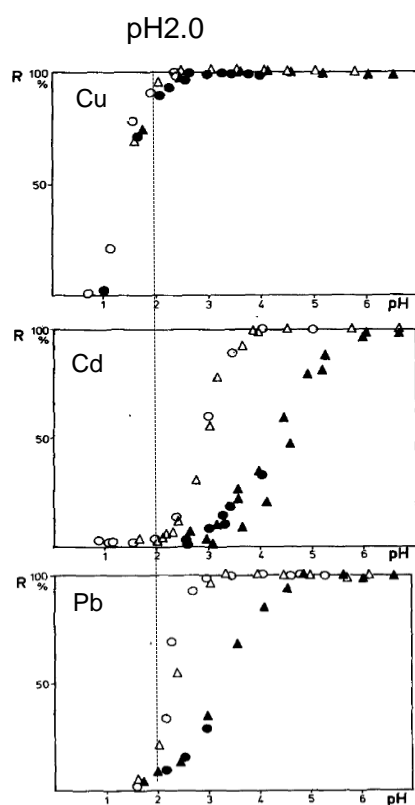


図 3-5-2 pH における金属(Cu、Cd、Pb)の吸着効率<sup>[10]</sup>

### 3-8 試薬実験手順

#### 3-8-1 紫外線による紫外線照射

有機物の UV 処理による分解は、産業技術総合研究所 環境部門の中里哲也博士に依頼した。UV 処理装置は、図 3-3 に示すように石英管と水銀ランプから構成されている<sup>[2] [3]</sup>。ポンプを用いて試料溶液を流速  $0.2 \text{ mL s}^{-1}$  通過させ、EDTA の分解を行った。EDTA は金属と安定な金属として使用され、UV 照射で有機物の分解効率の指標となる物質として使われている。そのため、本実験では、有機物の分解効率を検証するために、EDTA を標準試料として採用した<sup>[11]</sup>。

#### 3-8-2 陽イオン交換樹脂を用いた Cu イオンの除去

銅イオンの除去には、Chelex 100を用いて行った。0.5gのキレックス樹脂 (Chelex 100、200–400 dry mesh, Bio-Rad Laboratories) をEcono Column (cross sectional area  $1.77 \text{ cm}^2$ ) に充填した。樹脂を使用する前に、約5 mLの0.1 M HClで樹脂を洗浄し、その後0.1 M acetate buffer pH 2.0 ( $\text{Cd}^{2+}$ の場合) または0.1 M citrate buffer pH 2.0 ( $\text{Pb}^{2+}$ の場合)でコンディショニングを行った。その後、9.0 ml のUV処理した溶液に1.0 mlの1.0 M acetate buffer (pH 2.0) or 1.0 M citrate buffer (pH 2.0)を添加し、それぞれ最終濃度 0.1M (pH2.0)を作成した。その後、溶液をキレックスカラムに $0.4 \text{ mL min}^{-1}$ で通過させる。鉛の分析の場合は、そのままASV測定を行った。カドミウムの場合、ASVを行う前に最適なpHにするために、1.0 mLの1.0 M acetate buffer (pH 5.0) を添加してからASV測定を行った。重金属の電気化学分析は、第2章で行った条件と同様に測定した。実際に行った操作の模式図を図3-6に示す。

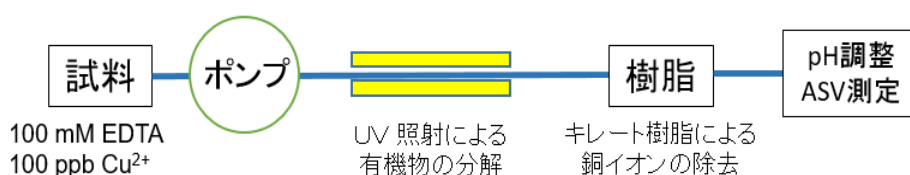


図 3-6 今回使用した妨害物質の前処理方法の模式図

### 3-9 実験結果

3-8 で実試料サンプルでも測定できるように、より簡便なシステムに適した前処理法として UV 照射装置とキレックス樹脂を選定した。この選定した前処理システムを用いて、実試料に模したサンプルでその効果の検証を行った。図 3-7 (a)と(b) に 0.1 mM EDTA と 100 ppb の  $\text{Cu}^{2+}$  存在下における、前処理前後の 50 ppb (A)  $\text{Cd}^{2+}$  と (B)  $\text{Pb}^{2+}$  のボルタモグラムを示す。前処理をする前は、カドミウムと鉛のピークは両方とも検出する事ができなかった (100 ppb  $\text{Cu}^{2+}$  と 0.1 mM EDTA 存在下：灰色線)。紫外線照射処理を行うと、EDTA はほとんど分解され、それぞれの金属と銅イオンの合金に由来する複数のピークが検出された。(100 ppb  $\text{Cu}^{2+}$  と 0.1 mM EDTA 存在下：黒破線) カドミウムの場合、純粋な  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  と  $\text{Cu}^{2+}$  のアロイ、純粋な  $\text{Cu}^{2+}$  の三つのピークが検出された。鉛の場合、純粋な鉛のピークは検出されなかった。この濃度では、鉛はすべて銅との合金を形成できるが、 $\text{Cd}^{2+}$  はすべて形成されなかった事が原因であると考えている。紫外線とキレックスカラム処理後 (100 ppb  $\text{Cu}^{2+}$  と 0.1 mM EDTA 存在下：赤線)、 $\text{Cd}^{2+}$  も  $\text{Pb}^{2+}$  のピークもほぼ完全に回復した。前処理を行うと検出下限は減少した ( $\text{Cd}^{2+}$ : 0.25→1.0 ppb、 $\text{Pb}^{2+}$ : 1.0→10 ppb)。検出下限は、妨害物質が無い場合よりも悪くなるが、溶液中に 0.1 mM EDTA と 100 ppb の銅が存在しても、前処理をすることで工場排水の基準値( $\text{Cd}^{2+}$ : 30 ppb、 $\text{Pb}^{2+}$ : 100 ppb) を達成することができた。

検出下限が悪くなった原因を突き止めるために、それぞれ前処理の除去効率を調査した。図 3-8 に、0.1mM EDTA とターゲットイオン( $\text{Cd}^{2+}$ または  $\text{Pb}^{2+}$ )を含む溶液を紫外処理する前後の(A)  $\text{Cd}^{2+}$ と(B)  $\text{Pb}^{2+}$ の検量線を示す。紫外線で処理する前は、EDTA が残存するため 0 から 50 ppb の範囲で  $\text{Cd}^{2+}$ 及び  $\text{Pb}^{2+}$ の酸化ピークが得られないのに対し、紫外線を照射すると酸化ピークが回復した。感度、繰り返し性、検出下限を比較すると、EDTA が存在しない場合とほぼ同じ結果を得る事ができた。また紫外線処理後の分解物による ASV の妨害がほぼ無い事も分かった。また図 3-7 (C) に EDTA 濃度に対する 10 ppb  $\text{Cd}^{2+}$ の ASV 電流値の関係を示す。EDTA の濃度が 0.05  $\mu\text{M}$  以上になると ASV におけるカドミウムの酸化ピークが減少し始めた。それゆえ、EDTA の分解効率は 99.9 %以上分解除去できている事が分かった。

一方、図 3-9 に、100 ppb  $\text{Cu}^{2+}$ とターゲットイオン( $\text{Cd}^{2+}$ または  $\text{Pb}^{2+}$ )を含む溶液を chelex カラム処理の前後の(A)  $\text{Cd}^{2+}$ と(B)  $\text{Pb}^{2+}$ の検量線を示す。キレックス処理を行うと、感度 (検量線の傾き) が 10%減少し、検出下限も約 1 桁 ( $\text{Cd}$ : 0.25→1.0 ppb、 $\text{Pb}$ : 1.0→10 ppb) 悪くなった。キレックス処理を使用すると感度と検出下限が減少した理由について考察した。図 3-5-2 が示すように pH 2.0 条件下において、 $\text{Cd}^{2+}$ あるいは  $\text{Pb}^{2+}$ において多少、親和性を持っている事を示す。そのため、chelex カラムに  $\text{Cd}^{2+}$ も  $\text{Pb}^{2+}$ イオンもある程度吸着してしまう事がわかった。そのため感度が減少し低濃度の分析ができなくなった事が分かった。しかしながら、キレックスカラムを使用することで、検出下限は悪くなるが、溶液中に 0.1 mM EDTA と 100 ppb の銅が存在しても、工場の排水基準( $\text{Cd}$ : 30 ppb、 $\text{Pb}$ : 100 ppb)を十分担保できる性能を達成することができた。またこれは、銅のみを処理することが可能にあれば、高感度分析が可能であることが分かった。

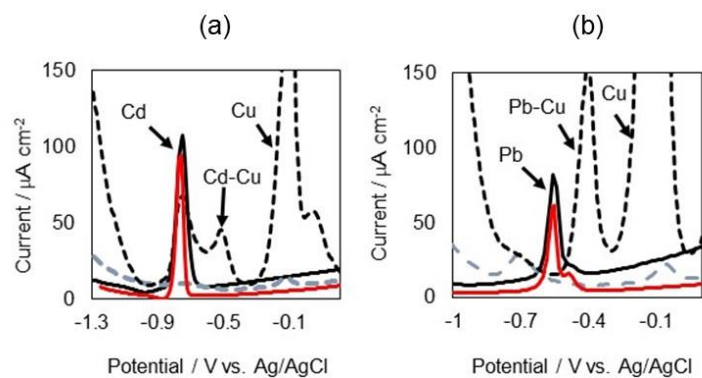


図 3-7 (a)  $\text{Cd}^{2+}$  と (b)  $\text{Pb}^{2+}$  のアノード stripping ボルタモグラム

黒線 : 50 ppb ( $\text{Cu}^{2+}$  と EDTA 存在しない)

黒破線 : 紫外線処理後 (100 ppb  $\text{Cu}^{2+}$  と 0.1 mM EDTA 存在下)

赤 : 紫外線とキレックスカラム処理後 (100 ppb  $\text{Cu}^{2+}$  と 0.1 mM EDTA 存在下)

灰色 : 紫外線処理前 100 ppb (100 ppb  $\text{Cu}^{2+}$  と 0.1 mM EDTA 存在下)

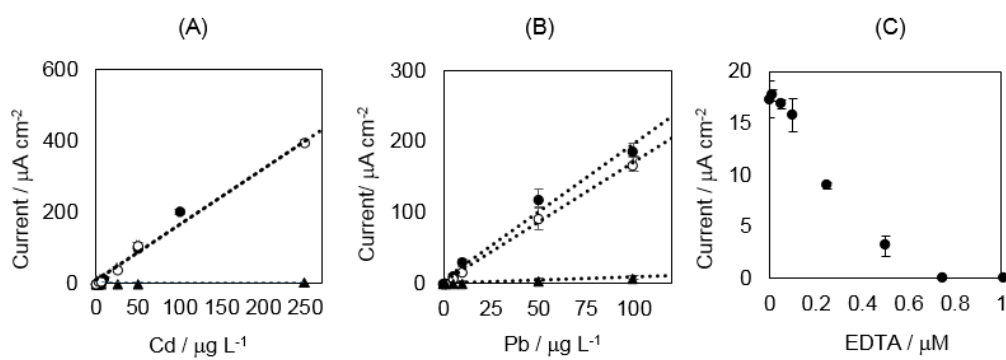


図 3-8 (A)  $\text{Cd}^{2+}$  と (B)  $\text{Pb}^{2+}$  紫外線処理による  $\text{Cd}^{2+}$  と  $\text{Pb}^{2+}$  の酸化電流の関係と

● EDTA なし、○ 0.1 mM EDTA あり (紫外線処理後)、▲ 0.1 mM EDTA あり (紫外線処理前)

(C) EDTA 濃度に対する 10 ppb  $\text{Cd}^{2+}$  の ASV 電流値の関係

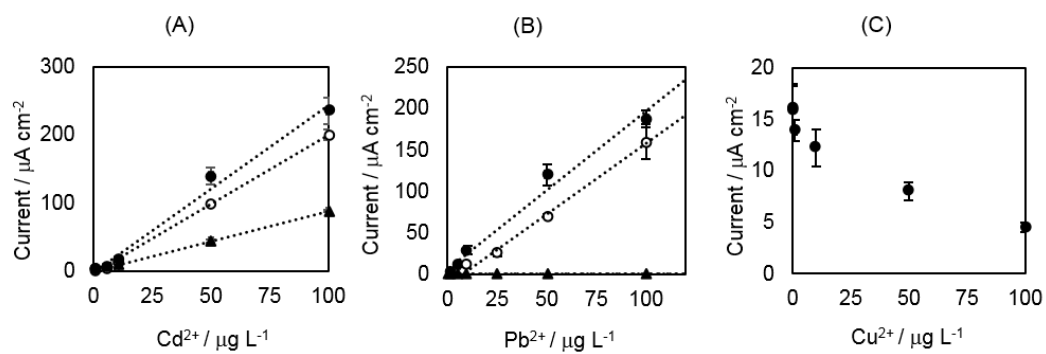


図 3-9 キレックス 100 による  $\text{Cd}^{2+}$  と  $\text{Pb}^{2+}$  の酸化電流の関係 ( (A)  $\text{Cd}^{2+}$ 、(B)  $\text{Pb}^{2+}$  )  
 $\bullet$   $\text{Cu}^{2+}$  なし、 $\circ$  100 ppb  $\text{Cu}^{2+}$  あり (chelex-100 処理後)、 $\blacktriangle$  with 100 ppb  $\text{Cu}^{2+}$  (chelex-100 処理前)  
 (C)  $\text{Cu}^{2+}$  濃度に対する 10 ppb  $\text{Cd}^{2+}$  の ASV 電流値の関係

### 3-10 結論

本研究では、紫外線照射装置とキレックス処理を使用することで、実試料を測定する前処理方法を検討した。ASV によるカドミウムと鉛の定量には、有機物と銅の妨害が予想され、妨害物質の影響が確認された。紫外線による分解において、検出下限や繰り返し測定に影響は無く、一方 Chelex 100 樹脂は、カドミウムも鉛もある程度吸着してしまうため、検出下限が悪くなった。しかしながら、有機物や銅イオンが存在しても、前処理を行う事で Cd と Pb の定量を行うことができた。その検出下限は、排水中に規制されている基準値を担保するに十分な検出下限が達成できた。今回の検討結果から紫外線照射とキレックスカラム処理で、妨害物質である有機物の分解と銅の除去が可能であり、本方法の有用性が確認された。



### 3-11 参考文献

- [1] R. Bock, *A Handbook of Decomposition Methods in Analytical Chemistry International Textbook Company* **1979**, 5th edition.
- [2] T. Nakazato, H. Tao, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 1665-1672.
- [3] T. Satou, T. Nakazato, H. Tao, *Anal. Sci.* **2013**, 29, 233-238.
- [4] J. A. Dean, *LANGE'S HANDBOOK OF CHEMISTR Fifteenth Edition*.
- [5] M. B. Shabani, T. Akagi, H. Shimizu, A. Masuda, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2709-2714.
- [6] T. Ogata, Y. Terakado, *Geochem. J.* **2006**, 40, 463-474.
- [7] G.-H. Hwang, W.-K. Han, J.-S. Park, S.-G. Kang, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2008**, 135, 309-316.
- [8] A. L. Brandes Marques, G. O. Chierice, *Talanta* **1991**, 38, 735-739.
- [9] A. Sugitani, T. Watanabe, T. A. Ivandini, T. Iguchi, Y. Einaga, *PCCP* **2013**, 15, 142-147.
- [10] P. Figura, B. McDuffie, *Anal. Chem.* **1979**, 51, 120-125.
- [11] W. Siriangkawut, K. Grudpan, J. Jakmunee, *Talanta* **2011**, 84, 1366-1373.

## 4 章 UBM カーボン薄膜を用いた、DNA に存在するメチルシトシンの簡便かつ高感度電気化学分析法の開発

### 4-1 緒言

我々の体には細胞から構成されており、様々な神経、組織など、多様な機能と取るにも関わらず、ほぼ全て同一の遺伝情報から分化・発達していると言われている。これらの情報は DNA の 4 種類アデニン、チミン、シトシン、グアニンの配列によって決定され、塩基配列を解読する事で遺伝情報の予測が可能となった。しかしながら、塩基配列以外に後天的に遺伝子発現を制御する機構がある事が明らかにされている。エピジェネティクスは、DNA 配列に変化が起これなくとも、その形質が細胞に受け継がれる事である<sup>[1]</sup>。またエピジェネティクス制御の異常は、がんなどの疾患になるといわれている<sup>[2]</sup>。また、エピジェネティクス制御の中でも、DNA を直接修飾するシトシンのメチル化は遺伝子発現を制御するため、重要な事あると考えられている。従って、DNA のメチル化を、簡便かつ高感度に検出する事は、重要である。今までに、メチルシトシンを測定する方法が開発されてきたが、装置が大型であるなど課題が残り、簡易的な方法が開発されると、新しい知見がられると期待できる。電気化学的手法は、測定装置が小型化で、オンサイト分析に適している。そのため、電気化学的バイオセンサは、遺伝子検査に用いる装置として有力な候補となっている<sup>[3] [4] [5]</sup>。

本研究では、DNA 中のメチルシトシンを簡便に解析できる新規電気化学的検出法の開発を目指した。

### 4-2 メチルシトシンを測定する意義

DNA のメチル化は、グアニンとの水素結合には関与しないためグアニンと塩基対を形成でき、シトシンとして情報が保たれる。しかし、メチルシトシンは、メチル化感受性タンパク質などのメチル化感受性物質に影響を及ぼし、遺伝子発現が不活性化されることが明らかになっている。図 4-1 の (上) に示すように、メチルシトシンは、シトシンがメチル化した塩基である。このメチルシトシンは、遺伝子の発現の制御をしていることが明らかになっている。図 1 の (下) に示すように、哺乳類において、遺伝子上におけるプロモーター領域の CpG 配列のシトシンが、メチル化されていない場合、転写因子により遺伝子の発現が行われる。一方、シトシンがメチル化していると、転写因子との結合が阻害され、それに伴い遺伝子の発現が行われない。このメチル化の有無によって遺伝子の制御が行われている。そのため、シトシンのメチル化の有無が正常にコントロールされる事が我々の生体にとって重要であり、また正常に制御されないと、多くの疾患がメチル化に関連していることも明らかになっている<sup>[6] [7] [8] [9]</sup>。従って、遺伝子の発現、疾患の診断という観点から、メチルシトシンの検出は重要である。

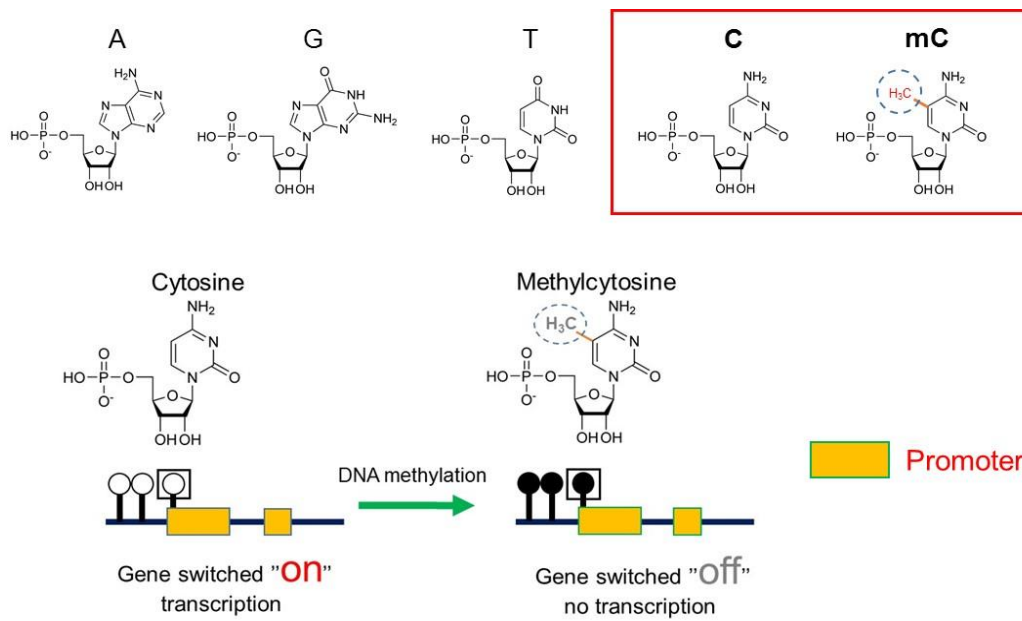


図 4-1 DNA 塩基(上) とシトシンとメチルシトシンの遺伝子発現の制御 (下)

#### 4-3 どのメチルシトシンを測定すべきか? (Global methylation と Local methylation)

メチルシトシンの測定方法は、Global methylation を検出する場合と Local methylation する場合に大きく分けられる。(図 4-2) Global methylation は、ゲノム全体に存在するメチルシトシンの総量を測定する方法である。一方 Local methylation は特定配列 (ピンポイント) のメチルシトシンを検出する方法である。実際、化学物質などの刺激によってシトシンがメチル化されるのはゲノム全体ではなく、特定の配列で起こるため、Local methylation を検出する事が、近年重要視されている。Local methylation 分析は、現在バイサルファイト定量法が広く使用されている<sup>[10] [11]</sup>。この方法は、亜硫酸ナトリウム塩で処理を行なうとシトシンが脱アミノ化されてウラシルに変換される。一方、メチルシトシンは亜硫酸ナトリウム塩の影響をほとんど受けない反応を利用している。従って、バイサルファイト処理サンプルと未処理サンプルを比較することで、配列中のメチルシトシンに関する情報を検出する事できる。例えば、バイサルファイト・シーケンス法<sup>[12]</sup>、バイサルファイトと制限酵素を組み合わせた分析法 (COBRA)<sup>[13]</sup>、メチル化特異的 PCR 法<sup>[14]</sup>、ピロシーケンス法<sup>[15] [16]</sup>では、単一の配列のメチル化状態の検出例が報告されている。

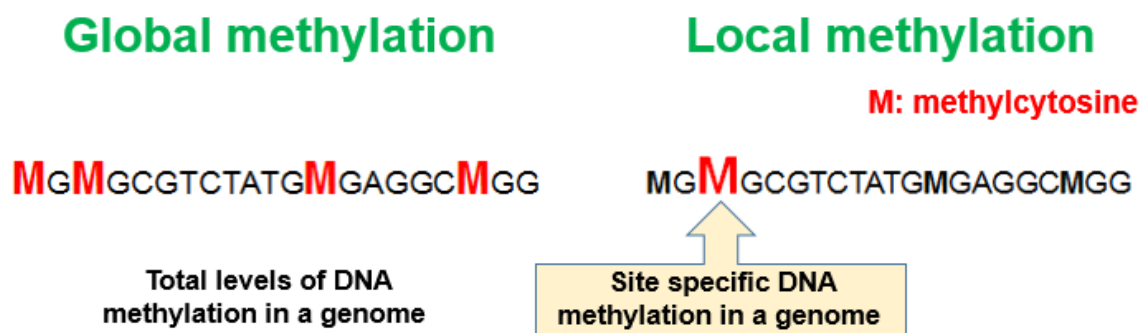


図 4-2 Global methylation と Local methylation

#### 4-4 バイサルファイト法以外の Local methylation を測定する方法

バイサルファイトの他に、既知のメチル化 DNA 検出法について述べる。

##### 4-4-1 四酸化オスミウムを用いた方法

四酸化オスミウム( $\text{OsO}_4$ )と2,2'-ビピリジンを用いた反応は、シトシンに比べ、5-メチルシトシンを酸化することが報告されている<sup>[17]</sup>。しかし、オスミウムを用いた酸化反応はチミンで反応する問題点がある。しかしながら、岡本らは、塩基対を形成しているチミン或いはメチルシトシンと四酸化オスミウムの反応性がほぼ無くなる事に注目した。図4-3に示すように、アデニンからビピリジンを修飾したICONプローブ (Interstrand Complexes formed by Osmium and Nucleic acids: ICPN) プローブを開発し、PCR法と併用させることで、様々な組織に存在する特定配列中のメチルシトシンの検出に成功している。しかしながら、ICONプローブ法は、四酸化オスミウムは塩基対を形成していないチミンとも反応性があるため、チミンと反応しない配列設計の工夫が必要である。

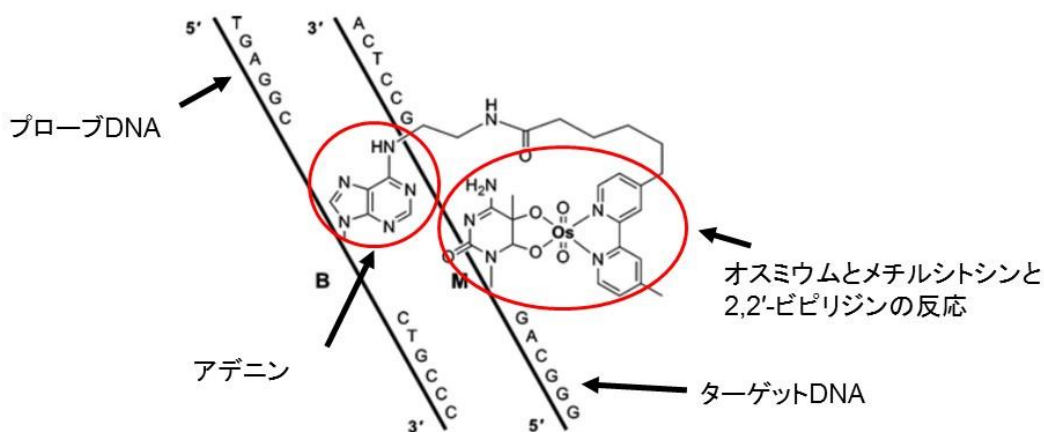


図 4-3 ICON プローブの構造<sup>[18]</sup>

#### 4-4-2 イムノアッセイ法

抗メチルシトシン抗体は、シトシンとメチルシトシンを認識し選択的にメチルシトシンと結合する抗体<sup>[19]</sup>であるが、グアニンと塩基対を形成したメチルシトシンとは、結合出来ない特性を有する。近年Kuritaらは、この抗メチルシトシン抗体の特性を利用することにより、測定対象のシトシンのメチル化の有無を判断できる方法を提案している<sup>[20] [21] [22]</sup>。この方法は、塩基配列中の測定対象とする部位の塩基を図4-4のようにバルジ構造にすることで、外側に配向させる。このとき、外側に配向している塩基は塩基対を形成していないため、抗メチルシトシン抗体はメチルシトシンと結合する。一方シトシンの場合は、外側に配向していても結合しない。それゆえ、結合した抗体に由来するシグナルを測定することにより、特定配列のメチル化状態を迅速かつ簡便に検出する方法である。検出系に、ELISA類似法を組み合わせた場合の検出下限は数nM<sup>[21, 23]</sup>であり、SPRとマイクロ流路を組みあせた方法での検出下限は、数百pM<sup>[24]</sup>の検出下限を達成できている。しかしながら、ゲノム中に存在する単一のメチルシトシンを検出する事ができないのが現状である。

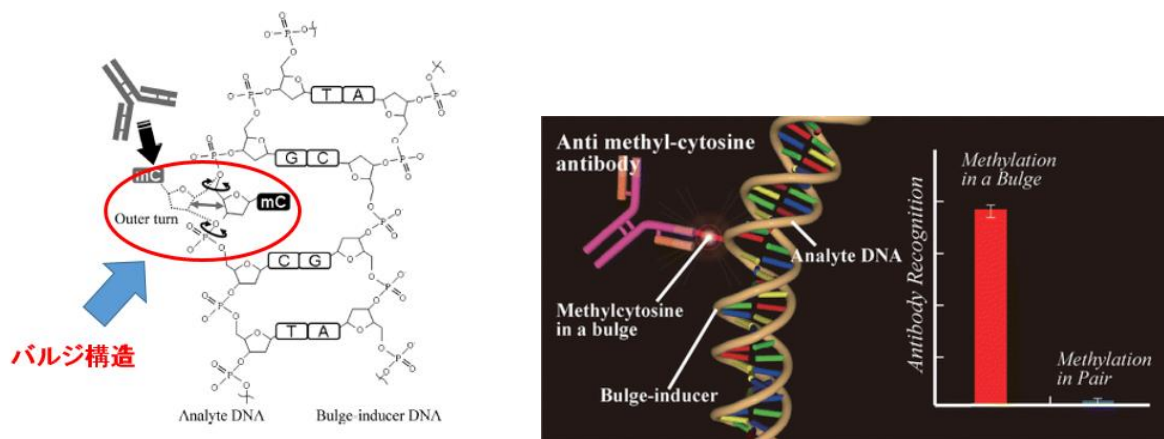


図 4-4 バルジ構造(左)とイムノアッセイを組み合わせた方法<sup>[20] [21] [22]</sup>

#### 4-5 本研究への着想に至った経緯 (金属ナノ粒子に基づく電気化学的メチルシトシン検出)

DNA 中のメチル化検出の簡易測定法は、遺伝子の発現の制御状態のモニタリング、DNA チップ、遺伝子由来疾患の検出などの応用面に重要である。現在、小型の光学系検出器も多数開発されている一方で、医療関係の電気化学センサに目を向けると、自己血糖管理用のセンサは、手のひらサイズで、使い捨ての印刷電極を用いており、家庭でも使用できる価格と簡便性を有している<sup>[25]</sup>。表 4-1 に電気化学的手法を用いたメチルシトシン検出法を示す。Tanaka らは、電気活性オスミウム錯体のメチルシトシンを標識するための一つの方法を報告している<sup>[26]</sup>。また Hou らは、メチル化感受性制限酵素および [Co(phen)<sup>3</sup>] を電気化学的な酸化還元指示薬として使用し、電気化学的メチルシトシンの定量法を報告している。<sup>[27]</sup> Sato and Takenaka らは、フェロセン化ナフタレンジミドを挿入剤に利用した電気化学的ハイブリダイゼーションアッセイを報告している<sup>[28]</sup>。また Kato らは、電子サイクロトロン共鳴 (ECR) スパッタリングによって加工された sp<sup>2</sup> 結合と sp<sup>3</sup> 結合が複合したナノカーボンフィルム電極を用いたメチルシトシンの直接酸化による電気化学的メチルシトシン定量<sup>[29] [30]</sup> について報告している。しかしこれらの方法は、表 4-1 に示すように様々なデメリットを有している。

以上の背景から、本研究では、電気化学的手法を取り入れる事とは別に、ゲノム中に存在する単一のメチルシトシンを検出する方法を開発する際に、2 つの観点からの考察を行った。一つは検出法自体の高感度化である。もう一つはアナライト自体の増幅をすることである。

前者にはセンシング系に増幅機能を付与ことによって高感度を達成できると考えた。後者については、COBRA (COmbined Bisulfite Restriction Analysis) 法の手法を取り入れることが有用であると考えた。COBRA 法とは、バイサルファイト処理後にメチル化と非メチル化 DNA の共通の配列に対して PCR で増幅後、制限酵素の切断の有無でメチル化/非メチル化を区別する方法である。

前者の高感度増幅法として図 4-5 に示すようなアプローチを考えた。アナライトに結合した重金属ナノ粒子(量子ドット)に含有される多量の重金属の分子に基づく信号を電気化学的に測定する。重金属ナノ粒子のサイズが仮に 50 nm のサイズであるとする、形成されているカドミウムの分子数は約  $5 \times 10^4$  個以上となり、酸などで溶解した場合、かなりの金属イオンが溶解し、金属由来のシグナルの増幅が期待できる。また、この重金属ナノ粒子とアナライトとの結合が化学量論的に 1:1 で起こるようにデザインできれば、酸で溶解した金属イオンの総数から考えて、かなりの増幅率が達成出来ると期待した。同じような増幅系としてリポソームのような脂質二分子膜ベシクルに内封した蛍光色素を検出する方法もあり、 $10^6$  個以上の増幅検知が知られている<sup>[31]</sup>。しかしながら、リポソームのサイジングは難しく、化学量論的に認識部位の数を制御する事が難しいため、定量性に問題がある事が知られている。そのため粒子のサイズが一定で、認識部位の数をある程度制御できる金属のナノ粒子を用いることで定量性と再現性が向上すると考えた。

後者に関しては COBRA 法を用いた。4-4-2 で述べたように、抗メチルシトシン抗体などを用いた直接検出法では、一般的な PCR を使用できないため、ゲノム上の単一に存在するメチルシトシンを検出するのに感度が足りない。そのため、検出法の増幅だけでなく、メチルシトシンの情報を保ちつつサンプルを増幅する必要があると考察した。そこで、従来から使用されている、COBRA 法に注目した。このアプローチは、バイサルファイト PCR 法を用いたアッセイ法となるので、直接検出法に比べ行程が増えるが、その代わり感度と定量性が得られると考えた。

バイサルファイト PCR 法の原理を図 4-6 に示す。バイサルファイト処理した DNA をサンプルに PCR を行くと、メチル化の有無で増幅される DNA の配列が異なる。また図 4-6 示すように、PCR は、増幅し

たいDNAとプライマー、ポリメラーゼを用いて、標的DNAを増幅する原理である。まず、標的二本鎖DNAを熱変性(94～96℃)して一本鎖とし、次にプライマーを一本鎖DNAにアニーリング(55～60℃)させ、最後に(72～74℃)で伸長反応を進める。この1サイクルで原理的にターゲットDNAは2倍になる。従って理論的には  $n$  サイクルの反応で標的DNAは $2^n$ 倍に増幅され30サイクルで約100万倍～1000万倍に増幅することが可能である。メチルシトシンを直接検出するわけではないが、PCR法を用いる事で、メチルシトシンの情報を保ったままサンプルの増幅が可能になる。PCR法を採用することで、DNAの必要量を少なくすることが可能になると考えた。

また図4-7に示すように重金属の標識が1:1で起こるようにプローブDNAを設計した。ハイブリダイゼーションを行った後に、末端のビオチンを介して重金属ナノ粒子を結合させ、酸で溶解した重金属イオンに基づく電気信号を検出する事で増幅検出を期待した。

以上に示す方法を組み合わせる事で、極微小の試料でも特定配列中に存在するメチルシトシンを検出できると考えた。

表 4-1 既報論文における電気化学的なDNAメチル化解析の利点と欠点

著者	測定法	利点	欠点
Tanaka et al <sup>[26]</sup>	Electro-active osmium complex	バイサルファイトフリー 簡単・迅速	フリーのチミンと反応がある
Hou et al <sup>[27]</sup>	Methylation-sensitive restriction enzyme and [Co(phen) <sup>3</sup> ]	ラベルフリー	錯体形成行程が必要
Sato et al <sup>[28]</sup>	Hybridization with ferrocenylnaphthalene diimide	簡単・迅速	準配列選択性検出
Kato et al <sup>[29-30]</sup>	Direct oxidation detection with a nanocarbon electrode	バイサルファイトフリー 簡単・迅速	検出下限が mM オーダー



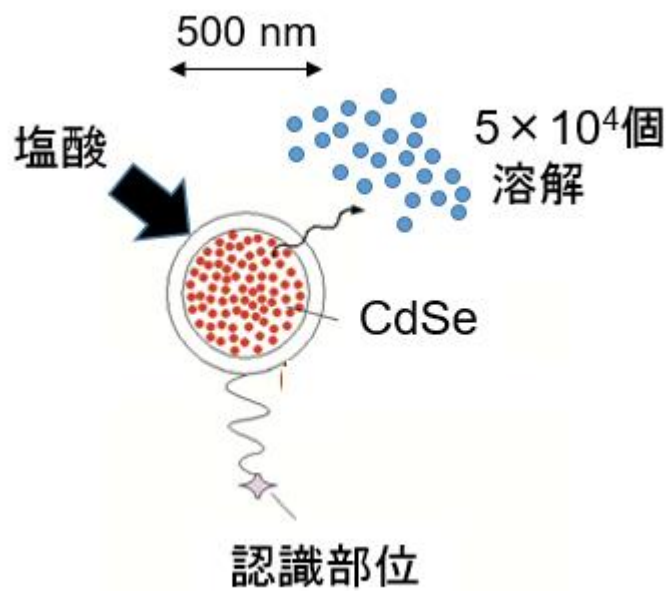


図 4-5 高感度増幅のための増幅法

## サンプルの増幅

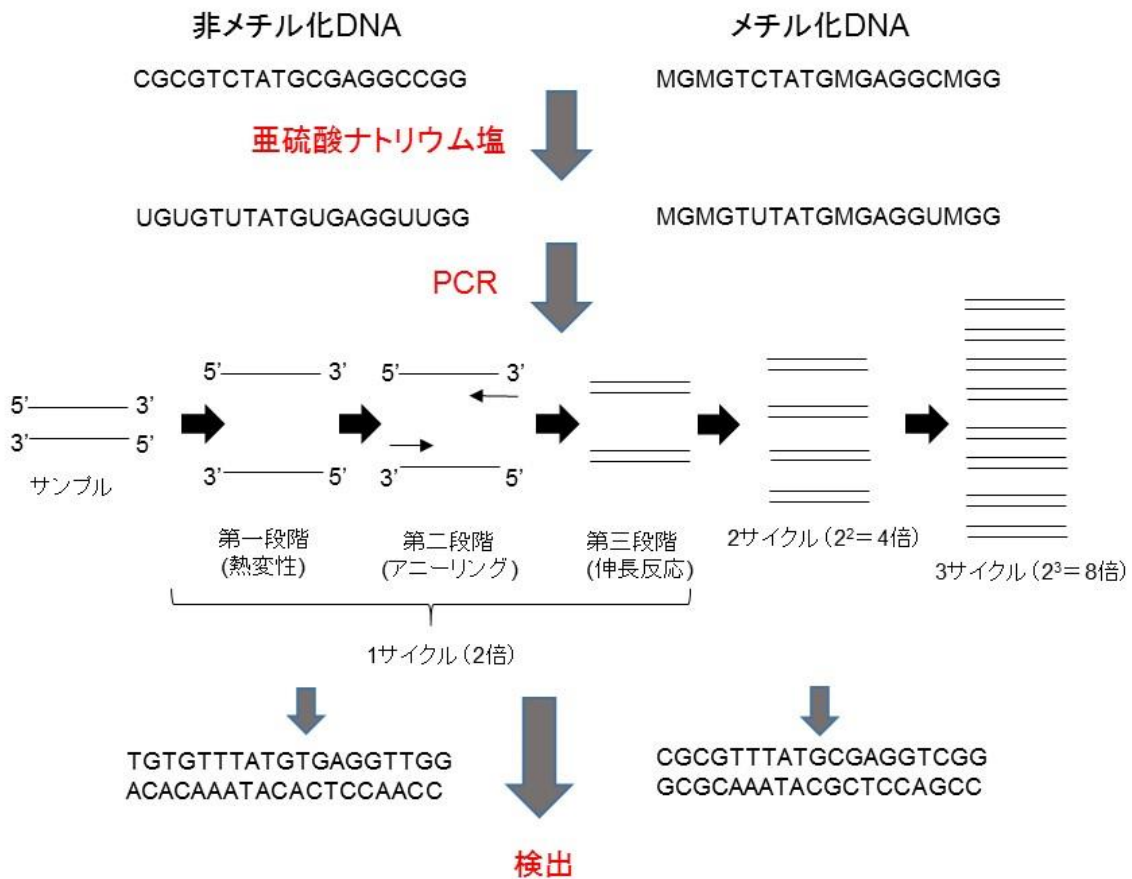
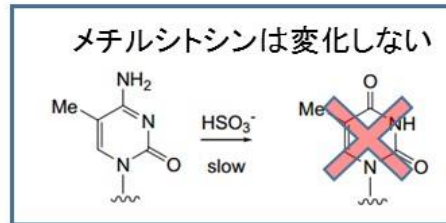
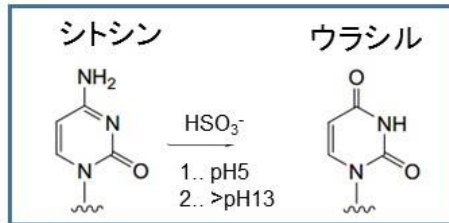
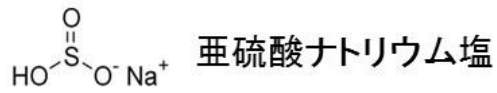


図 4-6 バイサルファイト-PCR 増幅法



## 4-6 実験方法

### 4-6-1 実験試薬

- DNA ポリメラーゼ (Ex Taq、TaKaRa Bio 製)
- デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP、TaKaRa Bio 製)
- $\lambda$ DNA (TaKaRa Bio 製)
- ダルベッコリン酸緩衝液 pH7.4 (Sigma Aldrich 製)
- CpG メチルトランスフェラーゼ (New England Biolabs 製)
- 制限酵素 HpyCH4IV (New England Biolabs)
- HCL (関東化学製)
- 尿素 (ナカライテクス製)
- 0.2 mol/L 緩衝酢酸溶液 pH 5.0 (ナカライテクス製)
- ビオチン (和光純薬製)
- Q-dot 605 ストレプトアビジン・コンジュゲート (Life Technologies 製)
- ストレプトアビジン固定マイクロプレート (住友ベークライト製)
- すべての実験で超純水(Milli-Q)を使用した。
- 合成オリゴ DNA は全てジーンデザイン製を使用した。(配列は表 4-2 に示す)

### 4-6-2 PCR

$\lambda$ DNA (1 $\mu$ g) は、付属反応緩衝液 (20 $\mu$ l) との S-アデノシルメチオニン (80 $\mu$ l) を添加して 4U の CpG メチルトランスフェラーゼ、2 時間、37 度の条件で反応させた。その後、Agilent DNA 1000 キットと Agilent 2100 バイオアナライザを使用し電気泳動で確認した。本検出法に使用する二つの洗浄溶液を調整した。一つは、洗浄溶液として 0.05% (v/v) の Tween 20 を含む PBS 緩衝溶液を使用し、もう一つはインキュベーション buffer として、0.05% (v/v) の Tween 20 と 0.1% (w/v) のウシ血清アルブミンを含む PBS 緩衝溶液を使用した。

### 4-6-3 電極の作製

カドミウム測定に最も適している、 $sp^3$  結合が 50% 複合させたカーボン電極を使用した。電極の作成方法は、2 章と同様の方法で行った。

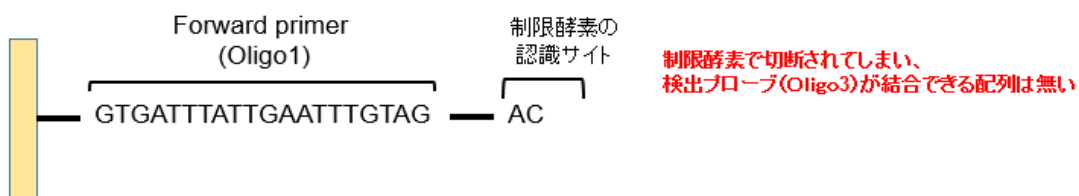
#### 4-6-4 ゲノム DNA の前処理(バイサルファイト処理、PCR、制限酵素処理)

バイサルファイト処理は市販キット(Tanaka-Bio 社の MethylEasy Xceed、キット品番 GR004)を使用し、メーカーのマニュアルに従って行なった。PCR 増幅は、20 pg のバイサルファイト処理済み DNA、1×Tka Ex Tag 緩衝液、2.5 mM の MgCl<sub>2</sub>、0.20 mM の dNTP ミックス、1 mM のフォワード(Oligo1)/リバープライマー (Oligo2) 、1.25 U の DNA ポリメラーゼで構成された 50 µL サンプルで行った。PCR の増幅条件は、変性サイクル(94°C、30 秒、30 回)、アニーリング (55°Cで 30 秒) 、エロンゲーション(72°Cで 30 秒) をサーマルサイクラー(TP600)で行った。プライマーは図 4-8 に示すように λDNA から 253-bp PCR 産物を生成するよう設計した。表 4-2 に、フォワードプライマー (Oligo 1)、リバープライマー (Oligo 2)の配列を示す。なおフォワードプライマーの 5 末端はビオチン化しているため、その PCR 産物のフォワード側だけをビオチン化しているため、尿素処理することで PCR 産物の片側だけストレプトアビジン表面で捕獲できるように設計した。図 4-8 に示すように PCR 産物の濃度は Agilent 2100 バイオアナライザによって確認した。100 nM の PCR 産物を 10 U の制限酵素 HpyCH4IV で処理する事で、メチルシトシンとシトシンの認識の識別を行った。(総量 10 µl、37°C、1 時間)

表 4-2 PCRで使用したプライマーの配列と検出に使用したプローブDNAの配列

名前		配列
Oligo 1	Forward primer	5'-(biotin)-GTGATTTATTGAATTTGTAG-3'
Oligo 2	Reverse primer	5'-ATAACCTCTTCCAACCAACA -3'
Oligo 3	Detection probe	5'-(biotin)-ATAACCTCTTCCAACCAACA -3'

### メチル化DNA



### メチル化されていないDNA

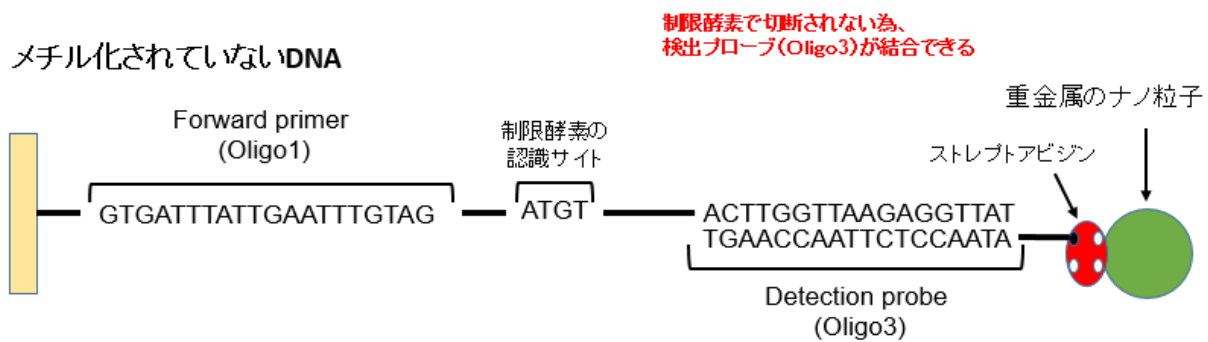


図4-8 制限酵素処理後、金属ナノ粒子を反応させた後のPCR産物

#### 4-6-5 電気化学検出

図 4-9 のように電気化学法で分析した。ストレプトアビジンプレートに 100  $\mu\text{L}$  の HpyCH4IV 処理 PCR 産物を反応し、室温で 0.5 時間置いた。余分な PCR 産物は、洗浄用緩衝液で 3 回プレートをすすいで除去した。次に、200  $\mu\text{L}$  の 8 M 尿素を加え、37°C で 0.5 時間置き PCR 産物を変性させフォワード側の PCR 産物だけをプレート上に回収し、200  $\mu\text{L}$  の 1 mg/ml ビオチンを加えて 37°C で 0.5 時間置きプレート上の、過剰ビオチン認識部位をブロックした。洗浄用緩衝液で 3 回プレートをすすいだ後、50  $\mu\text{L}$  の 50 nM ビオチン化検出プローブ DNA (Oligo3) を加え、37°C で 0.5 時間反応させた。洗浄後、50  $\mu\text{L}$  の 25 nM ストレプトアビジン標識ナノ粒子を各ウェルに加えて 37°C で 1 時間反応させた。図 4-8 に示すように、ナノ粒子標識付け後のメチル化 DNA 或いは非メチル化 DNA の略図を示している。メチル化 DNA の PCR 産物には、1 箇所の HpyCH4IV の切断認識部位があるため、ビオチン化検出プローブ(Oligo 3)でハイブリダイゼーションする配列はなくなる。一方、非メチル化 DNA には切断認識部位がないため、検出プローブは PCR 産物とのハイブリダイゼーションが可能であり、その結果として、カドミウム含有ナノ粒子が結合する。洗浄後、100  $\mu\text{L}$  の 1 M HCl を加えてナノ粒子からカドミウムイオンを溶解し、4.8 ml の 0.1 M 緩衝酢酸溶液 (pH 5.0) および 100  $\mu\text{L}$  の 1 M NaOH に混ぜて ASV 測定用に pH を最適化した。作用電極としての  $\text{sp}^3$  結合が 50% 複合した UBM ナノカーボン電極を用い、それ以外は 2 章と同じ電気化学セルと条件で測定を行った。

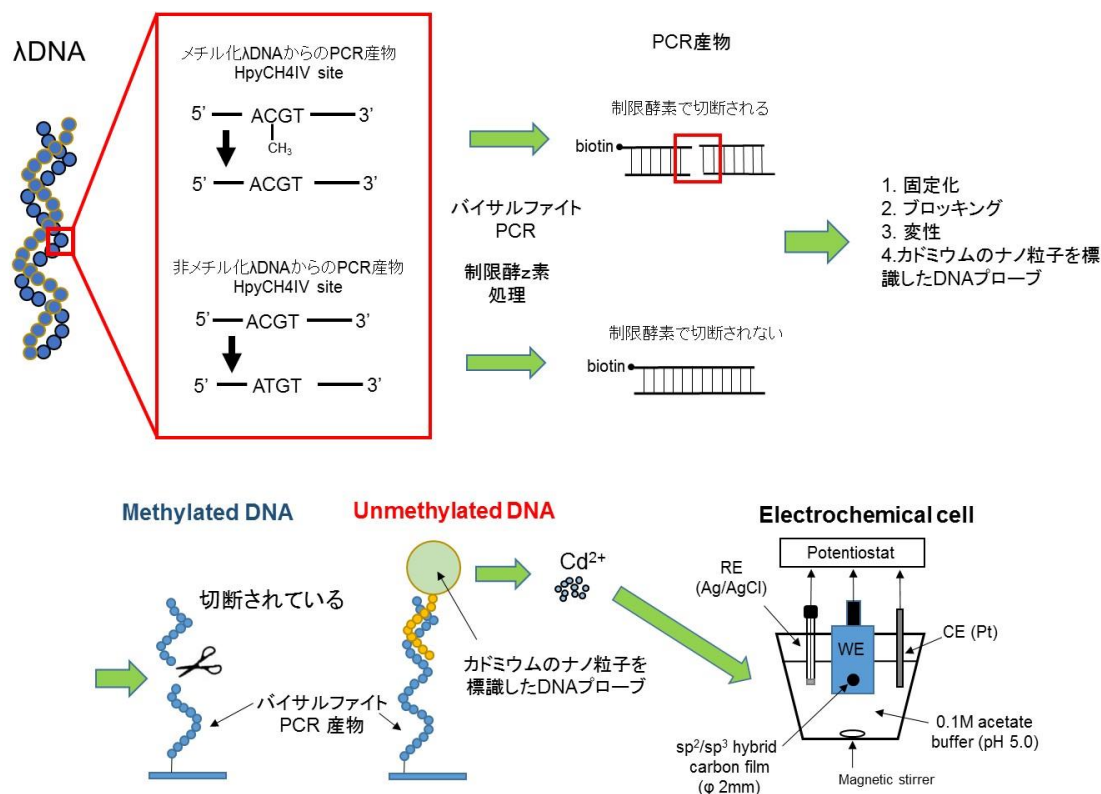


図 4-9 本メチルシトシン検出法の概要図

#### 4-6-6 電気泳動検出

本研究で開発した方法と比較のため、従来の電気泳動検出を用い DNA メチル化評価を行なった。HpyCH4IV 処理 PCR 産物を PBS で希釈した後、1  $\mu$ L の希釈 PCR 産物をメーカーマニュアルに従って Agilent 2100 バイオアナライザで分析した。PCR プロダクトの長さは 253-bp であるが、HpyCH4IV で処理すると 5'-ACGT-3'部位で PCR 産物の真ん中の 2 つの断片に消化する。4-6-4 の図 4-8 に示すように、HpyCH4IV 消化産物の電気泳動図のピークは 125-bp と 128-bp の断片が検出されるように配列を設計した。

#### 4-7 結果と考察

##### 4-7-1 メチル化・非メチル化 DNA の検量線

図 4-10 に、本方法を  $\lambda$ DNA で行い得られたボルタモグラムの結果を示す ((a)メチル化した  $\lambda$ DNA、(b)非メチル化  $\lambda$ DNA)。図 4-10 (a) のメチル化 DNA にはカドミウム由来のピークは得られなかった。これは 5'-ACGT-3'部位を認識し切断する制限酵素(HpyCH4IV)によるものである。標的シトシンがメチル化すると、PCR 産物には HpyCH4IV のバイサルファイト変換した PCR 産物の配列には、1 箇所の切断部位があるためである。従って、ナノ粒子標識付けのためのビオチン化検出プローブ(Oligp 3)ではハイブリダイゼーションは生じない。対照的に、標的シトシン(非メチル化)の場合、バイサルファイト変換した PCR 産物の配列に切断部位はない。これは、シトシンがウラシルに変換され、ウラシルは PCR のチミンに変換されるためである。

図 11 (a)に、本方法のナノカーボン電極で得られたメチル化・非メチル化ラムダ DNA の各種濃度の検量線を示している。ASV ピーク電流と非メチル化ラムダ DNA 由来の PCR 産物の関係は、0~10 nM までの間で直線関係が見られた。一方、メチル化ラムダ DNA 由来の PCR 産物ではシグナルは検出されなかった。このことは、幅広い濃度範囲でメチル化シトシン部位が HpyCH4IV によって効果的に切断された事を示している。カドミウムのナノ粒子は、蛍光性の粒子でもあるので、酸で溶解する前に蛍光測定を行った。表 4-3 に、電気化学測定、蛍光測定、市販の電気泳動アナライザ(Bioanalyzer 2100)で得られた結果を示す。表 4-3 が示すように、本研究で考案した方法は、比較的大きな RSD、ダイナミックレンジといった問題があるが、ナノカーボン電極の検出限界はその他の測定よりも低かった。電気化学または蛍光検出によって得られた結果は、類似の濃度依存性が見られるが、図 4-11 (b)に示すように蛍光シグナルには強いバックグラウンドシグナルがあった。蛍光検出と比べ低いバックグラウンドシグナルを示すため、高い S/N 比が実現でき、電気化学的検出法の検出下限が向上したと考えられる。本カーボン電極を使用して得られた検出限界は 0.5 nM であり、蛍光測定法の 2.5 nM と比較して低かった。この結果は、最も広く使用されている手法である電気泳動測定の結果 (2 nM) よりも優れていた。これは、本研究の 2 章で、ASV 測定におけるナノカーボンの  $sp^2/sp^3$  比の効果を調査し、環境分析でのカドミウムイオン定量のために最適化をしている<sup>[32][33]</sup>。このカーボン電極を用いた ASV 法によるカドミウムイオンの高感度検出によって達成できたと言える。



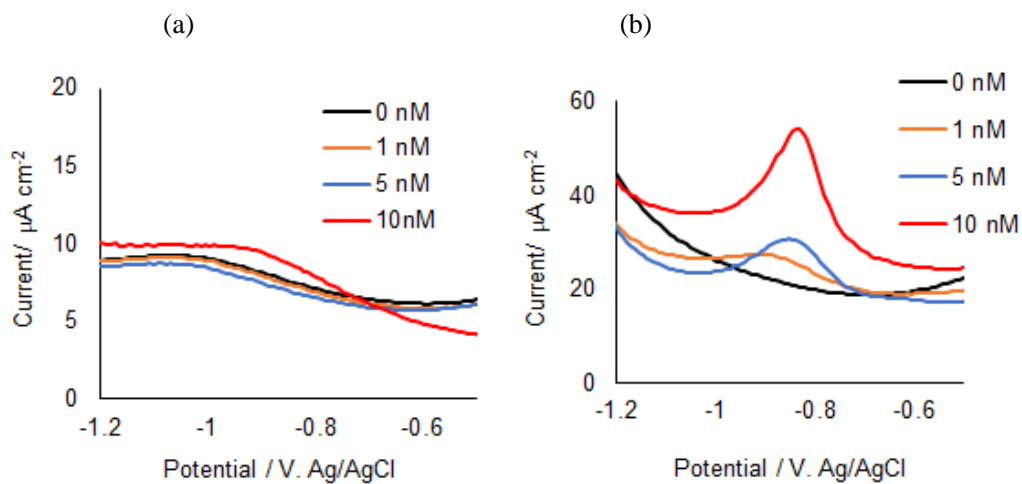


図 4-10 本方法で得られたボルタモグラム  
(a)メチルシトシン由来の PCR 産物( $\lambda$ DNA)、(b) シトシン由来の PCR 産物( $\lambda$ DNA)

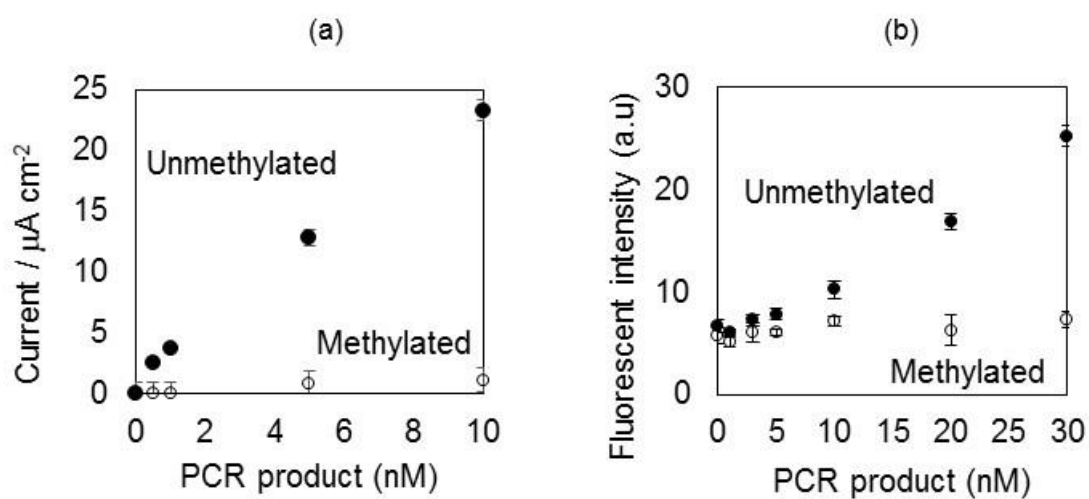


図 4-11 メチル化および非メチル化DNAの検量線  
(a) 本研究で電気化学的に検出した結果、(b) 蛍光検出した結果 Ex 350 nm Em 605 nm

表 4-3  $\lambda$ DNA 中に存在するメチルシトシンの電気化学測定、蛍光測定、電気泳動アナライザで得られた検出下限、ダイナミックレンジ、繰り返し性

	本方法 (電気化学検出)	蛍光検出	電気泳動
検出下限	0.5 nM	2.5 nM	2 nM
ダイナミックレンジ(nM)	0.5-10	2.5 - 30	2-50
RSD (%)	8.9% (10 nM)	8.9% (10 nM)	4.4% (25 nM)

#### 4-7-2 ゲノム中に存在する DNA のシトシンメチル化評価

次に、DNA 濃度が一定で、メチルシトシンの数が異なる試料を用いて本センサの応答を検討した。メチル化・非メチル化ラムダ DNA を混合し、0%、25%、75%、100%のメチルシトシンを含有したゲノム DNA を作成し、メチル化率を計測した。図 4-12 に示すように、電気泳動で標準試料の確認したものを使用した。

本方法における、各メチル化比のボルタモグラムを図 4-13 に示す。また、図 4-14 にメチル化率と電流値の関係を示す。●は制限酵素処理を行った結果、○はポジティブコントロールとして制限酵素未処理の結果を示す。図 4-14 (a)の●は、ナノカーボン電極による標的シトシンの DNA メチル化比分析の結果である。-0.9V のピーク電流は標的シトシンのメチル化比の増加に合わせて下降している。これは HpyCH4IV 切断比が上昇しているため、メチル化/非メチル化の混合したサンプルにおいてもメチル化と非メチル化を区別している事を示す。一方、制限酵素処理を行っていない場合、メチル化比とは無関係にほぼ定常の電流が確認された(図 4-14(a)の○)。これは、分析が正常に行なわれたことを示す。

また、カドミウムのナノ粒子から得られる蛍光測定法を用いた結果は図 4-14 (b)に示す。電気化学的結果と同様、いずれの強度もメチル化比の増加とともに下降しているが、蛍光法を用いた方法では蛍光強度とメチル化比の関係性は大きな曲線になっている。これは、図 4-15 に示すように、ナノ粒子濃度との関係において検出限界近くでの蛍光強度が非線形になっているためである。電気化学測定と従来測定は相関的な結果を見せており、本方法で提案する電気化学法には以下の利点があると言える。まず、ナノカーボン電極を使用して得られた検出限界 (0.5 nM) は、蛍光測定 (2.5 nM) よりも低かった。さらに、DNA メチル化の電気化学的検出法には高いコストパフォーマンス、低消費電力、小型化の容易さといった固有の利点がある。将来的に様々な場所での活用という観点から、これらは重要な要素であると言える。表 4-4 に  $\lambda$ DNA と PCR プロダクトの関係を示す。0.5 pg の  $\lambda$ DNA が入手できれば、本方法を行うのに十分な PCR 産物が得られる事を示し、極微小の試料でも特定配列のメチルシトシンの定量も可能であることを示す。

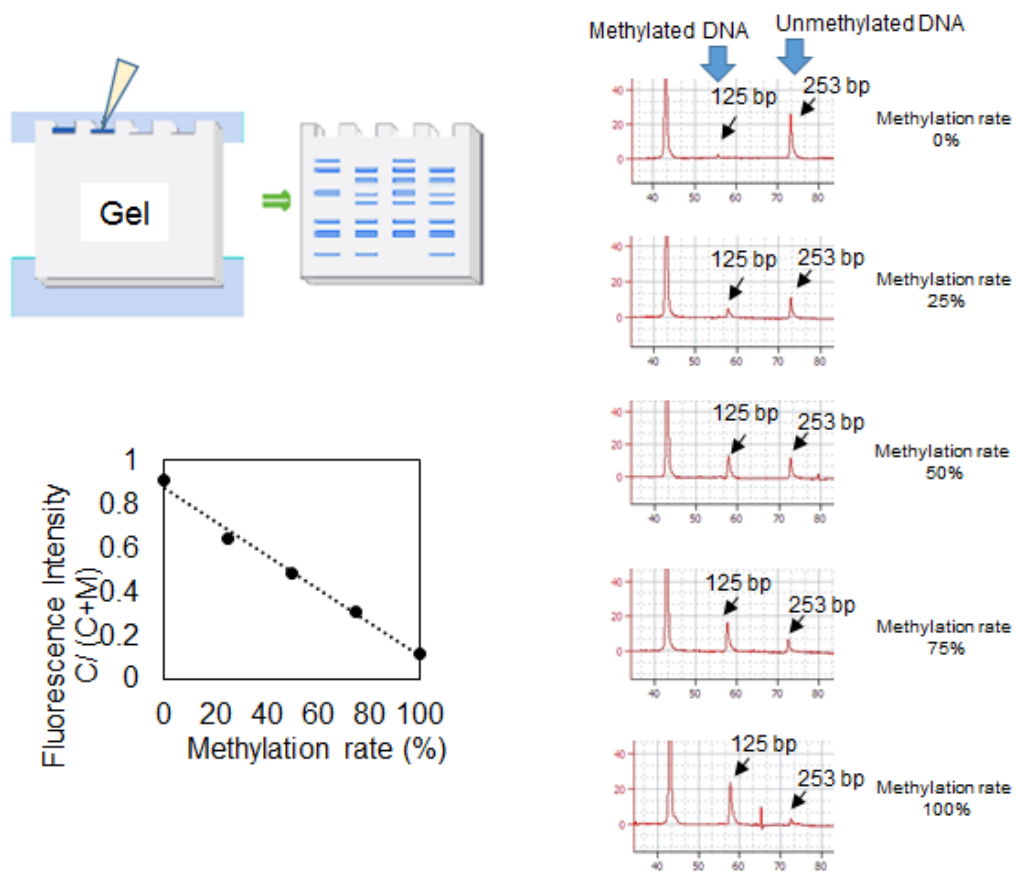


図 4-12 電気泳動法におけるメチル化率と蛍光との関係(左)とエレクトロフェログラム(右)

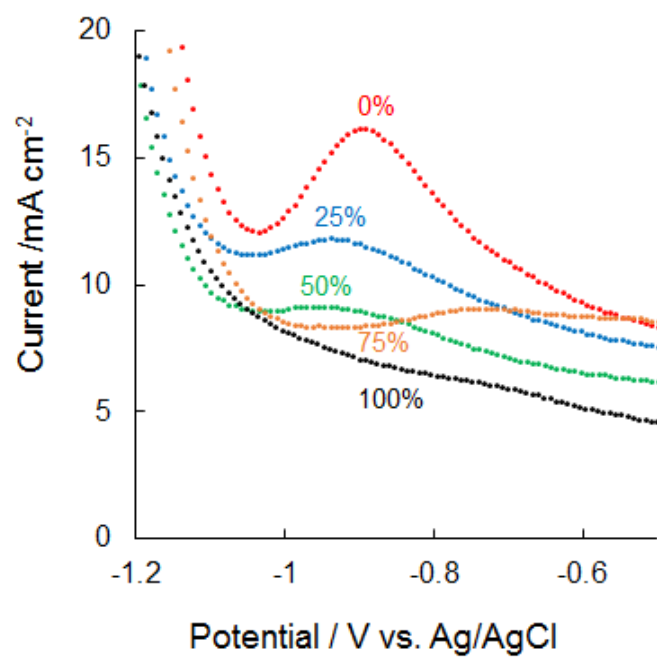


図4-13 本方法を用いてメチル化比率を測定した際のボルタモグラム

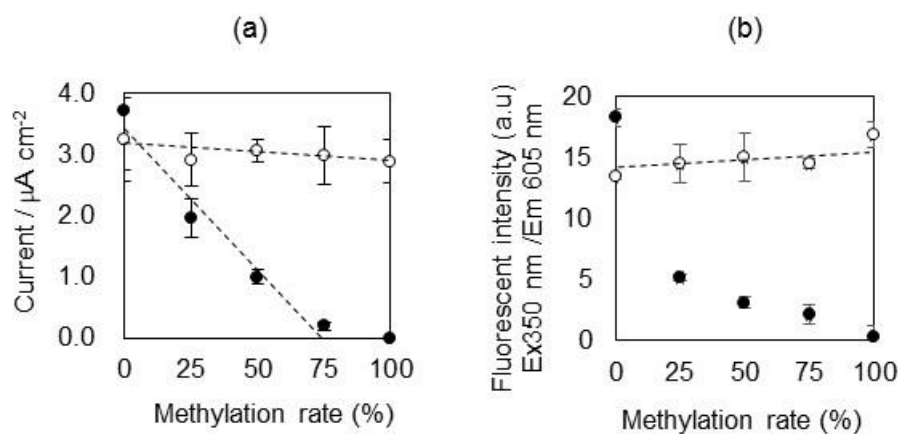


図4-14 ゲノムDNA中のメチル化比率とシグナルの関係

(a) 本研究で開発した電気化学検出法、(b) 酸で溶解する前のカドミウムナノ粒子から得られる蛍光検出Ex 350 nm Em 605 nm

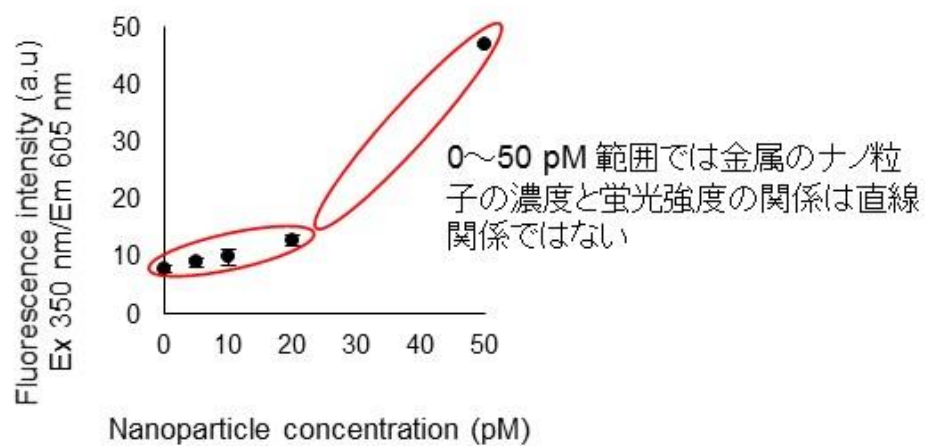


図 4-15 低濃度領域のカドミウムナノ粒子と蛍光強度の関係 (Ex 350 nm Em 605 nm)

表 4-4  $\lambda$ DNA と PCR 産物の関係

$\lambda$ DNA (pg)	PCR 産物 (nM)
0	N.D
0.1	N.D
0.5	3.9
1	7.6
5	64.8
10	106.2

#### 4-8 結論

本研究では、バイサルファイト制限分析およびカドミウム含有ナノ粒子標識付けとの組み合わせによる、ナノカーボンフィルム電極を用いた電気化学的な DNA メチル化評価手法を提案した。従来の蛍光測定や電気泳動測定と比較して、ナノカーボンフィルム電極による ASV 測定によって得られた PCR 産物の検出限界は最も低かった。これらの結果は、ASV 法という高感度な電気化学的手法を活用して、DNA 中の特定のメチルシトシンを、カドミウムイオンをマーカーとして検出できる事を示している。その結果、従来の電気泳動のような分離手法は必要としない、ピンポイントで簡便にメチル化状態を解析できる新規電気化学的アッセイ法を構築した。この方法により、ゲノム DNA のメチル化状態を正しく得ることができた。本研究で検討したナノカーボン電極は、環境重金属分析のみならず、プローブ DNA にカドミウム含有ナノ粒子で標識付けすることにより生体分析にも有益である事が示された。

今回使用したナノ粒子に付加しているストレプトアビジンは、粒子上に 1 個から数個されているため、化学量論的に 1:数個で測定は行われている。また市販されているカドミウムのナノ粒子が約 5 nm であるので、このサイズの粒子から溶出するカドミウムイオンはせいぜい 50 個イオン程度であり、約 50 倍のシグナルの増幅しか行われてない。例えば、重金属のナノ粒子の粒形を 10 倍大きくすれば、溶出するカドミウムイオンは 1000 倍増加するので、化学量論的に 1:1 にデザインさえできれば、より高感度な検出分析が期待できる。

#### 4-9 終わりに

ヒトゲノムが解読された現在、研究者たちの関心は、染色体上のどこにどのような遺伝子配列があるのか。といった静的な遺伝子マッピングから、どの遺伝子配列が、何をきっかけに、どのような経路で変異を起こすのか、という疾患に関わる遺伝子動態にうつりつつある。そのような状況下で、簡便なメチルシトシン検出法を、一次検査などに使用し、スクリーニング法などに展開すれば、遺伝子由来の病気とメチルシトシンの関連性について新しい知見が得られると期待される。

#### 4-10 参考文献

- [1] aV. L. Chandler, *Cell*, **128**, 641-645; bB. Eva Jablonka, Gal Raz, *The Quarterly Review of Biology* **2009**, **84**, 131-176.
- [2] T. Mikeska, J. M. Craig, *Genes* **2014**, **5**, 821-864.
- [3] S. R. Mikkelsen, *Electroanalysis* **1996**, **8**, 15-19.
- [4] E. Palek, M. Fojta, *Anal. Chem.* **2001**, **73**, 74 A-83 A.
- [5] J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2002**, **469**, 63-71.
- [6] K. D. Robertson, *Nat Rev Genet* **2005**, **6**, 597-610.
- [7] P. A. Jones, *Cancer research* **1996**, **56**, 2463-2467.
- [8] S. Ledoux, J. Nalbantoglu, N. R. Cashman, *Brain research. Molecular brain research* **1994**, **24**, 140-144.
- [9] M. Monk, *Developmental genetics* **1995**, **17**, 188-197.
- [10] S. J. Cokus, S. Feng, X. Zhang, Z. Chen, B. Merriman, C. D. Haudenschield, S. Pradhan, S. F. Nelson, M. Pellegrini, S. E. Jacobsen, *Nature* **2008**, **452**, 215-219.
- [11] M. Frommer, L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy, C. L. Paul, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, **89**, 1827-1831.
- [12] C. Bock, S. Reither, T. Mikeska, M. Paulsen, J. Walter, T. Lengauer, *Bioinformatics (Oxford, England)* **2005**, **21**, 4067-4068.
- [13] Z. Xiong, P. W. Laird, *Nucleic Acids Res.* **1997**, **25**, 2532-2534.
- [14] J. G. Herman, J. R. Graff, S. Myohanen, B. D. Nelkin, S. B. Baylin, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, **93**, 9821-9826.
- [15] R. Rajagopalan, H. Vaucheret, J. Trejo, D. P. Bartel, *Genes & development* **2006**, **20**, 3407-3425.
- [16] A. S. Yang, M. R. Estecio, K. Doshi, Y. Kondo, E. H. Tajara, J. P. Issa, *Nucleic Acids Res.* **2004**, **32**, e38.
- [17] K. Tainaka, A. Okamoto, in *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., **2001**.
- [18] A. Okamoto, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, **7**, 21-26.
- [19] M. F. Fraga, M. Esteller, *BioTechniques* **2002**, **33**, 632, 634, 636-649.
- [20] R. Kurita, K. Arai, K. Nakamoto, D. Kato, O. Niwa, *Anal. Chem.* **2012**, **84**, 1799-1803.
- [21] R. Kurita, O. Niwa, *Anal. Chem.* **2012**, **84**, 7533-7538.
- [22] R. Kurita, H. Yanagisawa, K. Yoshioka, O. Niwa, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, **70**, 366-371.
- [23] R. Kurita, H. Yanagisawa, K. Yoshioka, O. Niwa, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, **70**, 366-371.
- [24] R. Kurita, H. Yanagisawa, K. Yoshioka, O. Niwa, *Anal. Chem.* **2015**.
- [25] J. Wang, *Chem. Rev.* **2008**, **108**, 814-825.
- [26] K. Tanaka, K. Tainaka, T. Kamei, A. Okamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, **129**, 5612-5620.
- [27] P. Hou, M. Ji, C. Ge, J. Shen, S. Li, N. He, Z. Lu, *Nucleic Acids Res.* **2003**, **31**, e92.
- [28] S. Sato, M. Tsueda, Y. Kanezaki, S. Takenaka, *Anal. Chim. Acta* **2012**, **715**, 42-48.
- [29] D. Kato, N. Sekioka, A. Ueda, R. Kurita, S. Hirono, K. Suzuki, O. Niwa, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, **130**, 3716-3717.
- [30] D. Kato, K. Goto, S. Fujii, A. Takatsu, S. Hirono, O. Niwa, *Anal. Chem.* **2011**, **83**, 7595-7599.
- [31] H. Yanagisawa, A. Hirano, M. Sugawara, *Anal. Biochem.* **2004**, **332**, 358-367.
- [32] H. Yanagisawa, R. Kurita, T. Kamata, K. Yoshioka, D. Kato, A. Iwasawa, T. Nakazato, M. Torimura, O. Niwa, *Anal. Sci.* **2015**, **31**, 635-641.
- [33] H. Yanagisawa, R. Kurita, T. Yoshida, T. Kamata, O. Niwa, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, **221**, 816-822.

## 第5章 総括

本章では、1章から4章までを、以下のようにまとめた。

第1章では、重金属の産業への応用例とその毒性についてまとめた。重金属を測定する意義と従来法について整理し、電気化学的手法の一つであるASV法が、重金属の簡易分析法として最も適している事を示した。また、従来のASV法の課題である水銀電極を用いた測定について示した。更に、この背景を踏まえ本研究の目的を示し、本研究における論文の構成を示した。

第2章では、重金属のASV測定に求められている、毒性がなく、取り扱いが容易な固体電極として、カーボン電極について整理した。 $sp^2$ 結合と $sp^3$ 結合が複合したカーボン薄膜は、異種元素をドーピングすることなく電気伝導性を保つことが可能であり、還元側に電位窓が広いことため $Cd^{2+}$ や $Pb^{2+}$ といった卑な金属も水素イオンの還元には妨害されず電極上に析出できる。また常温で薄膜状に作製する事が可能であるため、汎用性が広い事及び重金属測定用の電極として優れたカーボン素材である事を示した。測定溶液の組成やpH等の $Cd^{2+}$ と $Pb^{2+}$ の測定条件の最適化を行った後、カーボン薄膜中の $sp^2/sp^3$ 比が感度、ノイズ、検出限界に及ぼす影響を明らかにした。その結果、 $sp^3$ 結合が50%複合したカーボン薄膜が $Cd^{2+}$ と $Pb^{2+}$ の分析に最も適していることを明らかにした。得られた検出限界は、従来電極と比較すると、1桁低い検出下限であり、(検出下限 $Cd^{2+}$ : 0.25 ppb、 $Pb$ : 1.0 ppb)、WHO飲料水水質ガイドラインの基準(検出下限 $Cd^{2+}$ : 3 ppb、 $Pb$ : 10 ppb)に対して十分担保できる性能を達成できた。

第3章では、第2章で検討したカーボン薄膜電極を用いた重金属分析法で、工場排水のモニタリングで使用する前処理法の開発を目的とした。まずは、工場排水における処理技術についてまとめた。続いて排水中に存在する妨害物質とその濃度を想定した。ASV法のオンライン測定を考慮し、有機物を分解除去するUV照射装置、銅イオンを除去できるキレックスカラムを選択した。工場排水に模した人工排水を用いて、前処理を行い、本ASV法の実証実験を行った。その結果として妨害物質(EDTA、銅イオン)が存在しても、低い検出下限(検出下限 $Cd^{2+}$ : 1 ppb、 $Pb$ : 10 ppb)ができ、排出基準(検出下限 $Cd^{2+}$ : 30 ppb、 $Pb$ : 100 ppb)のみならず、WHOの飲料水の基準(検出下限 $Cd^{2+}$ : 3 ppb、 $Pb$ : 10 ppb)に対して担保できる性能を達成でき、前処理法とカーボン薄膜電極を組み合わせた重金属分析法の有用性を実証した。

第4章では、第2章までに実現した重金属測定法をDNAメチル化分析に応用した。まず、メチルシトシンの生体内における役割を述べた。その後、メチルシトシンの検出法開発の意義について述べ、従来方法についてまとめた。ゲノムDNA中の単一のメチルシトシンを直接検出する方法は難しく、様々な増幅が必要である事を示し、二つの観点からの考察を行った。一つは検出法自体の増幅、もう一つは測定対象である被検体の増幅が必要である事を示した。検出法の増幅検知には、重金属を含むナノ粒子を標識し、その溶解により生成する重金属イオンをASV法により検出する方法を、被検体の増幅にはバイサルファイトPCR法が最も適していること示した。以上の事を踏まえ、従来の電気泳動のような分離手法は必要としない、ピンポイントで簡便にメチル化状態を解析できる新規電気化学的検出法を考案し、 $\lambda$ DNA中の単一のメチルシトシンの簡易検出法の開発を目指した。その結果として、本カーボン電極を使用して得られた単一のメチルシトシンの検出限界は0.5 nMであり、蛍光測定法の検出限界である2.5 nMよりも低かった。更に、その結果は最も広く使用されている手法である電気泳動測定の結果(2 nM)よりも優れていた。これは、第2章で行ったASV測定におけるカーボン電極中の $sp^2/sp^3$ 比の最



適化と ASV 法によるカドミウムイオンの高感度検出によって達成できたことによるものである。

以上の本研究の結果から、UBM ナノカーボン薄膜は、環境重金属分析のみならず、DNA 中のメチル化分析にも有益であることを示すことができた。

## 発表リスト

### 本論文を構成する学術論文

1. Yanagisawa, H.; Kurita, R.; Yoshida, T.; Kamata, T.; Niwa, O., Electrochemical assessment of local cytosine methylation in genomic DNA on a nanocarbon film electrode fabricated by unbalanced magnetron sputtering. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2015, 221, 816-822.
2. Yanagisawa, H.; Kurita, R.; Kamata, T.; Yoshioka, K.; Kato, D.; Iwasawa, A.; Nakazato, T.; Torimura, M.; Niwa, O., Effect of the  $sp^2/sp^3$  Ratio in a Hybrid Nanocarbon Thin Film Electrode for Anodic Stripping Voltammetry Fabricated by Unbalanced Magnetron Sputtering Equipment. *Analytical Sciences*. 2015, 31 (7), 635-41.
3. Yanagisawa, H.; Kurita, R.; Kamata, T.; Kato, D.; Niwa, O., Anodic Stripping Voltammetric Determination of Cd and Pb with Nanocarbon Film Electrode Fabricated by Unbalanced Magnetron Sputtering. *Electrochemistry* 2014, 82 (11), 949-953.

### その他の関係学術論文

1. Kato, D.; Kamata, T.; Kato, D.; Yanagisawa, H.; Niwa, O., Au Nanoparticle-Embedded Carbon Films for Electrochemical As Detection with High Sensitivity and Stability. *Anal. Chem.* **2016**. (In press)
2. Kurita, R.; Yanagisawa, H.; Yoshioka, K.; Niwa, O., On-Chip Sequence-Specific Immunochemical Epigenomic Analysis Utilizing Outward-Turned Cytosine in a DNA Bulge with Handheld Surface Plasmon Resonance Equipment. *Anal. Chem.* 2015.
3. Kurita, R.; Yanagisawa, H.; Yoshioka, K.; Niwa, O., Site-specific immunochemical methylation assessment from genome DNA utilizing a conformational difference between looped-out target and stacked-in nontarget methylcytosines. *Biosens. Bioelectron.* 2015, 70, 366-371.
4. Oomoto, I.; Suzuki-Hirano, A.; Umeshima, H.; Han, Y. W.; Yanagisawa, H.; Carlton, P.; Harada, Y.; Kengaku, M.; Okamoto, A.; Shimogori, T.; Wang, D. O., ECHO-liveFISH: in vivo RNA labeling reveals dynamic regulation of nuclear RNA foci in living tissues. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43 (19), e126.
5. Zhao, X.; Yang, Y.; Sun, B.-F.; Shi, Y.; Yang, X.; Xiao, W.; Hao, Y.-J.; Ping, X.-L.; Chen, Y.-S.; Wang, W.-J.; Jin, K.-X.; Wang, X.; Huang, C.-M.; Fu, Y.; Ge, X.-M.; Song, S.-H.; Jeong, H. S.; Yanagisawa, H.; Niu, Y.; Jia, G.-F.; Wu, W.; Tong, W.-M.; Okamoto, A.; He, C.; Danielsen, J. M. R.; Wang, X.-J.; Yang, Y.-G., FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell Res* 2014, 24 (12), 1403-1419.
6. Kurita, R.; Yanagisawa, H.; Niwa, O., Indoor allergen assessment quantified by a thin-layer electrochemical

cell and magnetic beads. Biosens. Bioelectron. 2013, 48 (0), 43-48.

## 国際会議における発表（在学期間中のみ）

### 口頭発表

1. Yanagisawa Hiroyuki, Kurita Ryoji, Tomoyuki Kamata, Kato Dai, Nakazato Tetsuya, Torimura Masaki, Niwa Osamu, PITTCON 2015, Anodic stripping voltammetric determination of Cd and Pb with nanocarbon film electrode fabricated by unbalanced magnetron sputtering. (2015, 3)

### ポスター発表

2. Yanagisawa Hiroyuki, Kurita Ryoji, Tomoyuki Kamata, and Niwa Osamu, 英国王立化学会 東京国際コンファレンス(RSC), Anodic stripping voltammetric determination of cadmium and lead with a  $sp^2$  and  $sp^3$  hybrid carbon film electrode fabricated by unbalanced magnetron sputtering equipment (2013.9)

## 国内における発表（在学期間中のみ）

### 口頭発表

1. 栗田 僚二, 柳澤 博幸, 吉岡 恭子, 丹羽 修, 第 75 回分析化学討論会, 遺伝子選択的なメチルシトシンのイムノアッセイ法の開発(2015.5.23)
2. 加藤 大喜, 鎌田 智之, 加藤 大, 柳澤 博幸, 丹羽 修, 第 75 回分析化学討論会, 金ナノ粒子埋め込みカーボン薄膜電極を用いた、水中ヒ素の電気化学検出(2015.5.23)
3. 吉田 岳史, 佐々木直樹, 柳澤 博幸, 栗田 僚二, 丹羽 修, 第 75 回分析化学討論会, DNA バルジ構造を利用した 5-メチルシトシンの電気化学分析(2015.5.24)
4. 栗田僚二、柳澤博幸、吉岡恭子、丹羽 修, 第 58 回化学センサ研究発表会 DNA の 2 重らせん中に存在するミスマッチ塩基の免疫化学的な状態解析とエピゲノム計測への応用 (2015.3.16)
5. 加藤大喜, 加藤大, 鎌田智之, 柳澤博幸, 丹羽修, 電気化学会秋季大会, 金ナノ粒子ドーブカーボン薄膜電極を用いたストリッピング法による水中ヒ素の高感度検出 (2014.9)
6. 柳澤博幸, 栗田僚二, 鎌田智之, 加藤大, 丹羽修, 第 74 回分析化学討論会,  $sp^2/sp^3$  ハイブリットカーボン薄膜とラジアルフローシステムを用いた Cd 及び Ag のアノードックストリッピングボルタンメトリー (2014.5)
7. Hiroyuki Yanagisawa, Ryoji Kurita, Tomoyuki Kamata<sup>a</sup> and Osamu Niwa, 化学センサ研究会, Anodic stripping voltammetric determination of cadmium and lead with a  $sp^2$  and  $sp^3$  hybrid carbon film electrode (2013.9)

8. 栗田僚二, 柳澤博幸, 吉岡恭子, 丹羽修, 化学とマクロ・ナノシステム研究会, DNA バルジを利用した位置選択的メチルシトシン計測チップの開発 (2013.5)
9. 栗田僚二, 柳澤博幸, 吉岡恭子, 丹羽修, 分析化学討論会, DNA バルジに配置されたメチルシトシンと抗体間での相互作用解析 (2013.5)

#### ポスター発表

1. 柳澤博幸, 栗田僚二, 鎌田智之, 加藤大, 吉岡恭子, 丹羽修, 日本分析関東支部 第 11 回茨城地区分析具術交流会,  $\text{Cd}^{2+}$  及び  $\text{Pb}^{2+}$  のアノードイクストリップングボルタンメトリーにおけるハイブリッドカーボン薄膜電極の  $\text{sp}^2/\text{sp}^3$  比の効果 (2014.12)
2. 柳澤博幸, 栗田僚二, 鎌田智之, 丹羽修, 日本分析化学会関東支部、第 10 回茨城地区分析技術交流会,  $\text{sp}^2$ ,  $\text{sp}^3$  ハイブリッドカーボン薄膜電極を用いた Cd 及び Pb のストリップングボルタンメトリー (2013.11)

#### 受賞

##### (優秀ポスター賞)

柳澤博幸, 栗田僚二, 鎌田智之, 丹羽修, 日本分析化学会関東支部、第 10 回茨城地区分析技術交流会,  $\text{sp}^2$ ,  $\text{sp}^3$  ハイブリッドカーボン薄膜電極を用いた Cd 及び Pb のストリップングボルタンメトリー (2013.11)

#### 特許(在学期間中のみ)

1. メチルシトシン検出法、整理番号 2013000335 出願中 (2013.3)
2. 金ナノ粒子含有電気化学測定用カーボン電極及び当該電極を用いたヒ素イオンの電気化学検出法、整理番号 2014001658 出願中 (2014.9)

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々にご協力を頂きました。ここに深く感謝いたします。

研究方針から大学生活全般において、ご多忙の中、3年にわたりご親切丁寧なご指導を頂きました、筑波大学大学院 数理物質科学研究科 物性・分子工学専攻（現、埼玉工業大学 先端科学研究所）丹羽修教授に謹んで感謝の意を表します。丹羽先生には、経験、知識、および研究方針などについて未熟な私を社会人枠の博士後期学生として研究室に受け入れて下さった事、論文作成や研究に関して指導して頂いた事、国内、海外ともに学会に参加させて頂いた事、最後まで公私に渡り暖かく見守って頂き、このように学位論文を提出できました。三年間の博士課程を通じて、一個人として大きく成長させて頂き、心より感謝いたします。

ご多忙の中、本論文審査をお受けくださり、ご助言、ご指導を頂きました筑波大大学院 数理物質科学研究科 物性分子工学専攻の長崎幸夫教授、木島正志教授、辻村清也准教授に心より感謝いたします。特に長崎先生には、お忙しい中、予備審査会、本審査会で主査をお引き受け頂き感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、産業技術総合研究所、バイオメディカル研究部門ナノバイオデバイスグループの栗田僚二グループリーダーには、国際論文の添削、実験の進め方に関する助言を指導して頂きました。またナノバイオデバイスグループおよび環境管理部門の皆さまにも、実験遂行や資料をまとめるにあたり、多くのご支援を頂き心より感謝いたします。在学中にバイオメディカル研究部門ナノバイオデバイスグループの非常勤職員として雇用して頂くと共に、社会人博士取得への機会を与えて頂いた産業技術総合研究所に心より感謝いたします。

最後に、筑波大学での学生生活を最後まで支えてくれた家族に感謝いたします。

平成 28 年 1 月 21 日

柳澤 博幸